



Universidade Federal do Maranhão  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação  
Centro de Ciências Biológica e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto



**ANÁLISE DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 16 E  
VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO CÂNCER DO  
COLO DO ÚTERO EM SÃO LUÍS - MARANHÃO, BRASIL**

**RODRIGO LOPES DA SILVA**

**São Luís - MA  
2018**

**RODRIGO LOPES DA SILVA**

**ANÁLISE DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 16 E  
VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO CÂNCER DO  
COLO DO ÚTERO EM SÃO LUÍS - MARANHÃO, BRASIL**

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

**Área de Concentração:**

Processos Biológicos em Saúde.

**Linha de Pesquisa:** HPV e Câncer.

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

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

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

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

Silva, Rodrigo Lopes da.

ANÁLISE DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO HPV 16 E VARIANTES  
GENÉTICAS ASSOCIADAS AO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM SÃO  
LUÍS - MARANHÃO, BRASIL / Rodrigo Lopes da Silva. - 2018.  
138 f.

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

Coorientador(a): Zulmira da Silva Batista.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2018.

1. Câncer do colo uterino. 2. HPV 16. 3.  
Papilomavírus humano. 4. Variantes. I. Zulmira da Silva  
Batista, Maria do Desterro Soares Brandão do Nascimento.  
II. Título.

**RODRIGO LOPES DA SILVA**

**ANÁLISE DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 16 E  
VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO CÂNCER DO  
COLO DO ÚTERO EM SÃO LUÍS - MARANHÃO, BRASIL**

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

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidata aprovada em: **23 / 03 / 2018**.

---

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

---

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

---

**Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa Pacheco**  
Universidade CEUMA

---

**Profa. Dra. Raimunda Ribeiro da Silva**  
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

---

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

---

**Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito - Suplente**  
Universidade Federal do Maranhão – UFMA



Dedico este trabalho a minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha trajetória. Sem eles eu não seria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por todas as dádivas que me concedeu

A minha família, em especial a minha esposa Diessika Helena, pelo apoio incondicional em todos os momentos, a minha mãe Maria de Jesus Lopes pela criação e educação que me proporcionou e a todos os demais que sempre estiveram do meu lado.

Agradeço a Universidade Federal do Maranhão – UFMA pelo apoio e infraestrutura fornecida durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança (PPGSAC) (Medicina II/CAPEES – Mestrado Acadêmico) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), a minha eterna gratidão.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pela orientação neste trabalho, apoio, dedicação e por sua disponibilidade em todos os momentos desta pesquisa.

A todos os professores do PPGSAD e funcionários do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão, UFMA; Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA, que tornaram possível a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Estudos Superiores (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), em especial ao Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga e a Profa. Dra. Claudene Barros, pelo auxílio no sequenciamento das amostras de HPV.

Agradecimentos à Profa. Dra. Flavia Castello Branco Vidal pela colaboração nesta pesquisa.

A eterna gratidão ao Prof. Dr. Miguel Ângelo Moreira do Departamento de Genética do Instituto Nacional do Câncer (INCa-RJ) pela contribuição e análise do sequenciamento e variantes para composição da árvore filogenética do Papilomavírus Humano 16.

À FAPEMA pelo fomento concedido a pesquisa, auxílio imprescindível a esta pesquisa pioneira no Estado do Maranhão.

Às pacientes registradas na investigação científica dos Hospitais do Câncer do Estado do Maranhão (UNACON) e do Hospital do Câncer Aldenora Bello (CACON) pelo aceite na participação da pesquisa.

Expresso também a minha gratidão às duas Instituições de Saúde habilitada em Oncologia pela permissão do levantamento de dados para a pesquisa como

também ao Instituto Nacional do Câncer (INCA) pela colaboração científica na análise das Variantes do Papiloma Vírus Humano (HPV) 16.

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

A todos os amigos da turma 13 do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD), em especial a amiga Mestranda Gerusinete Bastos por todo o apoio e ajuda nos momentos difíceis. Sem ela a realização deste trabalho não teria sido possível.

Agradecimentos especiais aos bolsistas da Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), Lailson Oliveira de Castro, Liwerbeth dos Anjos Pereira, pelo companheirismo e apoio.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre os ombros de gigantes”.*

**Sir Isaac Newton**

## RESUMO

**Introdução:** O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer que mais afeta as mulheres em todo o mundo, com mais de 80% dos casos ocorrendo em países em desenvolvimento. No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais frequente na população feminina sendo que o HPV está presente em aproximadamente 90% dos casos. Dentre os tipos virais, o HPV 16 apresenta elevada oncogenicidade sendo o mais prevalente em tumores cervicais. Evidências sugerem que as variantes de um mesmo tipo de HPV podem interferir biologicamente e etiologicamente no desenvolvimento do câncer de colo do útero. **Objetivo:** Objetivou-se estimar a frequência das variantes intratipo de HPV 16 em amostras do câncer do colo do útero de mulheres diagnosticadas em dois hospitais de referência em Oncologia no município de São Luís, Maranhão, no período de 2016 a 2017. **Material e métodos:** Dados socio-demográficos foram obtidos através de questionários aplicados às pacientes. Fragmentos tumorais de colo do útero foram coletados e submetidos a extração de DNA e, posteriormente, foram realizadas reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para a detecção do HPV. Foi utilizada a técnica de PCR Nested e os primers utilizados foram PGMY09/11 para o primeiro round e GP+5/6 para o segundo round. As amostras positivas foram submetidas a técnica de sequenciamento automatizado para a genotipagem do tipo viral. Para a caracterização das linhagens de HPV 16, amostras positivas foram submetidas a PCR utilizando primers específicos para amplificação das regiões LCR e E6 do vírus HPV 16. **Resultados:** Foram analisados os dados de 120 pacientes com câncer de colo do útero. A maioria das mulheres estava na faixa etária entre 41 e 54 anos de idade (44/36.67%), possuíam escolaridade até o ensino primário (51/42.50%), renda familiar entre 1 e 2 salários mínimos (66/55%) e eram casadas/união consensual (62/51.67%). Não houve resultado estatisticamente significativo entre a associação do HPV e variáveis sócio-demográficos e associadas a fatores de risco para o câncer do colo do útero ( $p < 0.05$ ). O HPV esteve presente em 88 mulheres (73%). Os tipos mais prevalentes foram o HPV 16 (47/54%), o HPV 18 (12/13.8%), o HPV 35 (6/6.9%) e o HPV 45 (5/5.7%). Dentre as 47 positivas para HPV 16, em 23 amostras foi identificada a variante A (49%), seguida pela variante D em 20 casos (43%) e as variantes B e C apresentaram 2 casos cada (4%). O tipo histológico de maior prevalência em tumores com HPV 16 foi o carcinoma epidermoide em 34 amostras (72%), seguido pelo adenocarcinoma em 5 amostras (11%). Observou-se que houve associação estatisticamente significativa entre as variantes de HPV 16 e os tipos histológicos dos tumores estudados ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** O conhecimento das variantes do HPV 16 fornecerá dados sobre a influência das mesmas com aspectos patológicos e oncogênicos das lesões de colo do útero.

**Palavras-chaves:** Câncer do colo do útero; Papilomavírus humano; HPV 16; Variantes.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cervical cancer is the fourth most common cancer in the world, with more than 265,000 deaths and more than 80% of cases occurring in developing countries. In Brazil, it is the third most frequent type of cancer in this population, and the Human Papillomavirus (HPV) is the etiologic factor for cervical cancer, being associated with approximately 90% of the cases. Among the viral types, HPV 16 shows high oncogenicity and is the most prevalent type in cervical tumors. Evidence suggests that variants of the same type of HPV can biologically and etiologically interfere with the development of cervical cancer. **Objective:** The objective of this study was to estimate the frequency of intra-HPV 16 variants in cervical cancer samples from women diagnosed in two reference hospitals in Oncology in the municipality of São Luís, Maranhão, from 2016 to 2017. Socio-demographic data were obtained through questionnaires applied to the patients. **Material and methods:** Tumor fragments of the cervix were collected and submitted to DNA extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR) reactions were performed to detect HPV. The Nested PCR technique used primers PGMY09 / 11 for the first round and GP+5/6 for the second round. Positive samples were submitted to automated sequencing technique for viral genotyping. For the characterization of HPV 16 strains, positive samples were submitted to PCR using specific primers for amplification of the LCR and E6 regions of HPV 16 virus. **Results:** Data from 120 patients with cervical cancer were analyzed. Among the patients, (44/36.67%) had primary schooling (51/42.50%), family income between 1 and 2 minimum wages (66/55%) and are married/consensual union (62/51.67%). There was no statistically significant result between HPV association and socio-demographic variables associated with risk factors for cervical cancer ( $p < 0.05$ ). HPV was present in 88 women (73%). The most prevalent types were HPV 16 (47/54%), HPV 18 (12/13.8%), HPV 35 (6/6.9%) and HPV 45 (5/5.7%). Among 47 positive for HPV 16, in 23 samples was identified A variant (49%) followed by D variant in 19 cases (40%) and B and C variants with 2 cases each (4%). The most prevalent histological type in HPV 16 tumors was epidermoid carcinoma in 34 samples (72%), followed by adenocarcinoma in 5 samples (11%). We found a statistically significant association between the HPV 16 variants and the histological types of the tumors studied ( $p < 0,001$ ). **Conclusion:** Knowledge of HPV 16 variants will provide insights into the influence of pathological and oncogenic cancers of cervical lesions.

**Keywords:** Cervical cancer; Human papillomavirus; HPV 16; Variants.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ADC</b>	Adenocarcinoma
<b>ADN</b>	<i>Adenocarcinoma</i>
<b>AGC</b>	<i>Atypical Glandular Cells</i> (Células Glandulares Atípicas)
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê Conjunto Americano de Câncer)
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASC</b>	<i>Atypical squamous cell of undetermined significance</i> (Célula escamosa atípica de significado indeterminado)
<b>BTMA</b>	Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão
<b>CACON</b>	Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia
<b>CCE</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>CCU</b>	Câncer do colo uterino
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)
<b>CE</b>	Carcinoma epidermoide
<b>CESC</b>	Centro de Estudos Superiores de Caxias
<b>CI</b>	Carcinoma Indiferenciado
<b>CT</b>	Tomografia Computadorizada
<b>DNA</b>	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<b>EV</b>	Epidermodisplasia Verruciforme
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
<b>FIGO</b>	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i> (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)
<b>GENBANK</b>	Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos
<b>HCAB</b>	Hospital do Câncer Aldenora Bello
<b>HPV</b>	<i>Human Papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
<b>HSIL</b>	<i>High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau)

<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer)
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>ISTs</b>	Infecções Sexualmente Transmissíveis
<b>JEC</b>	Junção Escamo-Colunar
<b>LCR</b>	<i>Long Control Region</i> (Região de Controle Longa)
<b>LSIL</b>	<i>Low-Risk Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intra-epitelial escamosa de baixo risco)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas).
<b>NIC</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical
<b>NMI</b>	Neoplasia Maligna Indiferenciada
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frames</i> (Quadros de leitura aberta)
<b>P53</b>	Proteína de 53kD
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polymerase)
<b>PET</b>	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por emissão de positrons)
<b>pRb</b>	Proteína do Retinoblastoma
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>SES</b>	Secretaria Estadual de Saúde
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TNM</b>	Classificação de Tumores Malignos
<b>UEMA</b>	Universidade Estadual do Maranhão
<b>UFMA</b>	Universidade Federal do Maranhão
<b>UICC</b>	Union for International Cancer Control (União para o Controle Internacional do Câncer)
<b>UNACON</b>	Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia



**WHO**

*World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

**ZT**

Zona de Transição

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Risco cumulativo de desenvolvimento do câncer do colo do útero após 20 anos por idade e por grupo de conduta (retorno de 12 meses). Adaptado de Simms <i>et al.</i> , 2017.....	21
Figura 2. Tendência na realização do rastreamento do câncer do colo do útero por grupo de idade entre mulheres na faixa etária de 18 – 65 anos de idade nos anos 2005 – 2014. Adaptado de WATSON; BENARD; FLAGG, 2018.....	22
Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo feminino, exceto pele não melanoma. (Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil), (Adaptado de: INCA, 2017).....	23
Figura 4. Taxas brutas de incidências estimadas para 2018 por sexo, segundo Estado e capital. (Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil), (Adaptado de: INCA, 2017).....	24
Figura 5. (A) Representação esquemática do colo do útero humano. (B) Corte histológico do colo. (Adaptado de: HERFS <i>et al.</i> , 2012).....	29
Figura 6: Estadiamento TNM para identificação do grau de extensão do câncer adaptado de TNM da <i>American Joint Committee on Cancer (AJCC)</i> (WITTEKIND; ASSAMURA; SOBIN, 2014).....	31
Figura 7: Representação esquemática do genoma do HPV. (Adaptado de: D'ABRAMO; ARCHAMBAULTI, 2011).....	35
Figura 8: Árvore filogenética do HPV. (Adaptado de: HARARI <i>et al.</i> , 2014).....	39
Figura 9: Esquema representativo do mecanismo de infecção do HPV no epitélio cervical. (Adaptado de: PEREZ-PLASENCIA <i>et al.</i> , 2008).....	42
Figura 10: A) Classificação atual das variantes de HPV 16. (Adaptado de BURK <i>et al.</i> , 2013). B) Sequência completa da árvore filogenética do HPV16. (Adaptado de: KUKIMOTO; MURAMATSU, 2015).....	47
Figura 11: Eletroferograma do sequenciamento de amostra positiva para o HPV 16, demonstrando-se que não houve infecção. Fonte: Autor próprio.....	60
Figura 12: Prevalência de tipos de HPV na população estudada. São Luís - Maranhão. 2016-2017.....	67
Figura 13: Tipos histológicos de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	68
Figura 14: Distribuição dos tumores positivos para HPV 16 de acordo com o estadiamento (n = 47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.....	69

Figura 15: Distribuição das variantes de HPV 16 na população estudada (n = 47). São Luís - Maranhão. 2016-2017..... 70

Figura 16: Árvore filogenética do HPV 16 com identificação de linhagens. O método utilizado foi Neighbour-Joining (para construção das filogenias) com distância “p” (obtidas com pairwise deletion), os números nos nós são valores de bootstrap (com 1000 réplicas)..... 73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação do genoma viral do HPV 16 e variantes com linhagens e sublinhagens. (Adaptado de BURK; HARARI; CHEN; 2013).....	49
Tabela 2: Distribuição dos dados sociodemográficos da população em estudo com câncer do colo do útero e a relação com o Papilomavírus Humano (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	64
Tabela 3: Características dos fatores de risco e história reprodutiva de pacientes com câncer do colo do útero e a relação com a presença do Papilomavírus Humano (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	65
Tabela 4: Distribuição dos pacientes conforme prática do exame preventivo e tabagismo. São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	66
Tabela 5: Estadiamento tumoral de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	69
Tabela 6: Relação entre idade, tipos histológicos e variantes de HPV 16 identificadas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.....	71
Tabela 7: Análise entre estadio clínico e as variantes de HPV 16 encontradas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.....	71
Tabela 8: Avaliação entre resposta ao tratamento e as variantes de HPV 16 encontradas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.....	72
Tabela 9: Distribuição de sublinhagens de HPV 16 de acordo com o tipo histológico (n=47). São Luís – Maranhão. 2016-2017.....	74

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	20
<b>2.1. Aspectos Epidemiológicos do Câncer do Colo do Útero</b> .....	20
<b>2.2. Análise Histórica do Câncer do Colo do Útero e o HPV</b> .....	25
<b>2.3. Aspectos clínicos associados ao HPV e Câncer do Colo do Útero</b> .....	26
<b>2.4. Aspectos Histológicos do Câncer do Colo do Útero</b> .....	27
<b>2.5. Estadiamento do Câncer do Colo do Útero</b> .....	30
<b>2.6. Rastreio do Câncer do Colo do Útero</b> .....	32
<b>2.7. Aspectos da Biologia do Papilomavirus Humano (HPV)</b> .....	34
<b>2.8. Classificação dos tipos de HPV</b> .....	37
<b>2.9. Ciclo de Vida e Carcinogênese Mediada pelo HPV</b> .....	40
<b>2.10. Variações Intratipo de HPV</b> .....	44
<b>2.11. Variantes de HPV 16 e o Câncer do Colo do Útero</b> .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3.1. Geral</b> .....	51
<b>3.2. Específicos</b> .....	51
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	52
<b>4.1. Tipo de Estudo</b> .....	52
<b>4.2. Período e Local do estudo</b> .....	52
<b>4.3. População e Amostra</b> .....	52
<i>4.3.1. Critério de inclusão</i> .....	52
<i>4.3.2. Critério de exclusão</i> .....	53
<b>4.4. Cálculo Amostral</b> .....	53
<b>4.5. Instrumento de coleta e avaliação de dados</b> .....	54
<b>4.6. Procedimentos experimentais</b> .....	54

4.6.1. <i>Extração do DNA</i> .....	54
4.6.2. <i>Quantificação de DNA</i> .....	55
4.6.3. <i>Detecção do DNA do HPV por PCR Nested</i> .....	56
4.6.4. <i>Visualização dos produtos amplificados</i> .....	58
4.6.5. <i>Purificação de produtos de PCR</i> .....	58
4.6.6. <i>Sequenciamento Automatizado</i> .....	58
4.6.7. <i>Identificação das variantes de HPV 16</i> .....	61
<b>4.7. Análise estatística</b> .....	61
<b>4.8. Análise por Filogenia</b> .....	62
<b>4.9. Aspectos Éticos</b> .....	62
<b>5. RESULTADOS</b> .....	63
<b>5.1. Dados sociodemográficos e clínicos</b> .....	63
<b>5.2. Identificação dos tipos de HPV</b> .....	66
<b>5.3. Tipos histológicos dos tumores analisados</b> .....	67
<b>5.4. As variantes do HPV 16</b> .....	70
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	81
REFERÊNCIAS .....	82
APÊNDICE .....	97
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	98
ANEXOS .....	100
Anexo A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa .....	101
Anexo B: Questionário Sociodemográfico .....	105
Anexo C: Recibo do Artigo submetido no European Journal of Cancer Preventio .....	116
Anexo D: Artigo submetido: Geographic disparity of cervical cancer: association with age, ethnicity/race and histopathological findigns.....	117
Anexo E: Normas da Revista European Journal of Cancer Prevention .....	131

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o quarto tipo que mais afeta mulheres mundialmente, com uma estimativa de mais de 265 mil mortes e mais de 80% dos casos ocorrendo em países em desenvolvimento (BAHLS *et al.*, 2017; BARROETA; ADHIKARI-GURAGAIN; GROTKOWSKI, 2017). De acordo com o INCA, o câncer do colo do útero ocupa a terceira posição entre os tipos de câncer mais incidentes na população feminina brasileira. São estimados 16.370 novos casos de câncer do colo do útero para o biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

Para o estado do Maranhão, são estimados cerca de 1090 casos novos de câncer do colo do útero para o ano de 2018, sendo 240 deles somente na capital, São Luís, com uma taxa bruta de incidência de 30,55 casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2017).

O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator etiológico do câncer do colo do útero e estão associados ao desenvolvimento de doenças que vão desde verrugas benignas até o câncer invasivo (DOORBAR *et al.*, 2016). Apesar de que, aproximadamente, 80% das mulheres adquirem a infecção pelo HPV até os 50 anos de idade, menos de 1% das infecções persistentes progridem para o câncer cervical invasivo (HANG *et al.*, 2016).

Permanece desconhecida a razão pela qual somente algumas lesões de cérvix uterina associadas a genótipos de alto risco progridem para o câncer invasivo. Evidências sugerem que as variantes de um mesmo tipo de HPV podem interferir biologicamente e etiológicamente no desenvolvimento do câncer (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; DUNN, 2006; XI *et al.*, 2007).

O HPV16 é o tipo de HPV mais carcinogênico seguido pelo HPV18 e a maioria das infecções são assintomáticas (CHEN *et al.*, 2016). Poucos estudos foram realizados no Brasil em relação ao estudo das variantes dos HPV 16. No Maranhão, este tipo de estudo nunca foi realizado. O interesse neste tópico vem crescendo muito nos últimos anos, tendo em vista possíveis variações no prognóstico dos carcinomas em diferentes estágios da doença, dependendo da variante viral encontrada. Mesmo em trabalhos realizados no mundo, muitas destas questões permanecem ainda não esclarecidas e muito achados são contraditórios,

tornando fundamental o desenvolvimento de novas e contínuas abordagens acerca desse tema.

Apesar da relação entre os diferentes tipos de HPV e o desenvolvimento do câncer estar bem estabelecido, evidências sugerem que variações genéticas entre um mesmo tipo viral podem influenciar no potencial de infecção, na persistência viral, no desenvolvimento de lesões precursoras e na progressão para o câncer invasivo (BERNARD, 2005; TAMEGÃO-LOPES *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; VIDAL *et al.*, 2016). Devido a elevada prevalência do HPV 16 em casos de câncer do colo do útero, a associação entre o HPV16 e o câncer vem sendo estudado ao nível de variantes intratipo, e várias linhas de estudo tem atribuído um maior risco de câncer cervical invasivo a algumas linhagens do HPV 16.

Os estudos sobre as variantes de HPV vem sendo desenvolvidas com o objetivo de compreender a associação das mesmas com aspectos patológicos e oncogênicos das lesões do colo do útero. Fatores que influenciam a infecção pelo HPV no câncer cervical não estão totalmente esclarecidos, mas acredita-se que as variantes de HPV 16 apresentam papel fundamental na carcinogênese cervical, sendo reconhecida atualmente como um importante marcador para pesquisa sobre transmissão viral, persistência e carcinogenicidade (HANG *et al.*, 2016). Estes aspectos entre as diferentes variantes podem contribuir para as disparidades na incidência do câncer cervical.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Aspectos Epidemiológicos do Câncer do Colo do Útero

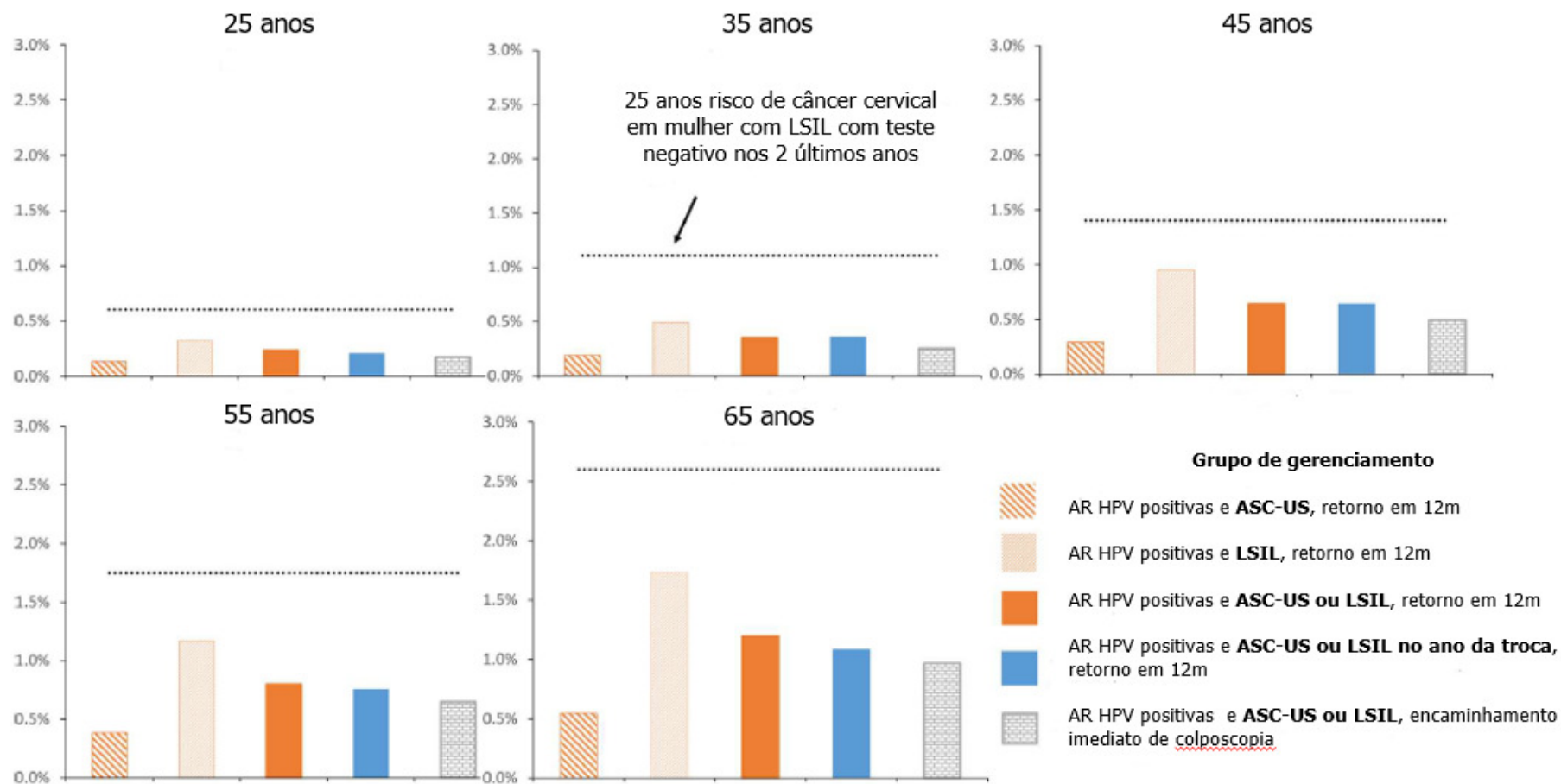
O câncer do colo do útero representa o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo (BRUNI *et al.*, 2017). Existem, no mundo, cerca de 2.784 milhões de mulheres acima de 15 anos que estão em risco de desenvolver o câncer do colo do útero (BRUNI *et al.*, 2017). Além disso, a cada ano, 527.624 mulheres são diagnosticadas com câncer cervical e 265.672 morrem por causa dessa doença.

Dados de Bruni *et al.*, (2017) indicam que 444.546 casos de câncer cervical ocorrem anualmente em países em desenvolvimento e 83.078 em países desenvolvidos. O número de mortes por câncer cervical também é elevado em países em desenvolvimento quando comparado com países desenvolvidos, com 230.158 e 35.514 casos, respectivamente. Além disso, estima-se que o número de mulheres desenvolvendo o câncer do colo do útero anualmente no mundo será de 700 mil até o ano de 2030 (OGILVIE *et al.*, 2017).

Ao longo dos últimos vinte anos, a disponibilidade de testes para detecção do Papilomavirus Humano tem levado a melhor compreensão sobre a história natural do câncer cervical (WATSON *et al.*, 2018).

Apesar de que, aproximadamente, 80% das mulheres adquirem a infecção pelo HPV até os 50 anos de idade, menos de 1% das infecções persistentes progredem para o câncer cervical invasivo (HANG *et al.*, 2016).

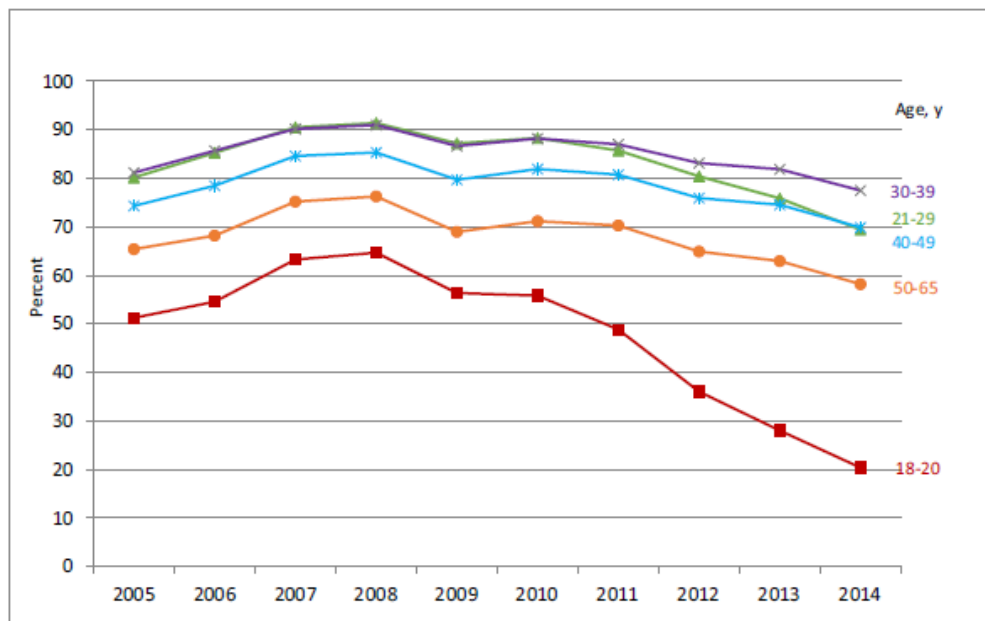
Em um estudo de Simms *et al.*, (2017), buscou-se determinar a melhor conduta para o rastreamento do câncer cervical de mulheres positivas para o HPV. O risco em 20 anos de câncer do colo do útero em mulheres positivas para HPV (exceto HPV 16 e 18) e lesões de baixo risco (LSIL) aumenta com a idade. O risco de desenvolvimento de câncer cervical invasivo em mulheres com LSIL e teste citológico negativo nos últimos dois anos varia entre 0.5% aos 25 anos de idade, chegando a 2.5% aos 65 anos (Figura 1).



**Figura 1.** Risco cumulativo de desenvolvimento do câncer do colo do útero após 20 anos por idade e por grupo de conduta (retorno de 12 meses). Adaptado de Simms *et al.*, 2017.

Nos Estados Unidos, a prevalência do HPV é de 45% em mulheres entre 14-59 anos de idade. Em um estudo de Watson *et al.*, (2018), observou-se um declínio na realização do rastreamento do câncer cervical entre mulheres na faixa etária de 18 – 20 anos, reduzindo de 55,8% em 2005 para 20,4% em 2014 (WATSON *et al.*, 2018). O declínio também foi observado em outras faixas etárias, mas entre as faixas de 21 – 29 e 30 – 39 anos, a prevalência de rastreio foi similar entre os anos do estudo (Figura 2) (WATSON *et al.*, 2018).

Estudos realizados no Brasil mostrou uma prevalência de infecção por HPV entre 13.7-54.3% na população em geral e entre 10-24.5% em mulheres com citologia normal (COLPANI *et al.*, 2016). Em pacientes com câncer do colo do útero, o DNA do HPV tem sido detectado entre 55.2-91% dos casos, dependendo do tipo de amostra biológica e do método utilizado para a detecção viral (REZVANI *et al.*, 2016). Estudos recentes também indicam a presença do HPV em 75% dos casos de câncer vaginal, 69% de câncer vulvar, 91% de câncer anal e 63% de casos de câncer de pênis (RAZZAGHI *et al.*, 2017).




**Figura 2.** Tendência na realização do rastreamento do câncer do colo do útero por grupo de idade entre mulheres na faixa etária de 18 – 65 anos de idade nos anos 2005 – 2014. Adaptado de WATSON; BENARD; FLAGG, 2018.

No Brasil, observa-se grande diferença entre as taxas de incidência do câncer do colo do útero entre as diferentes regiões. Na região Norte é o primeiro mais

incidente entre mulheres (25,62/100 mil). Nas regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil), ocupa a segunda posição. Já nas regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA, 2017).

Segundo estimativas do INCA, para o biênio 2018-2019 são estimados 16.370 casos novos de câncer do colo do útero para cada ano, com um risco aproximado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres. Ele ocupa a terceira posição no país e o sétimo lugar no ranking mundial (INCA, 2017). (Figura 3).

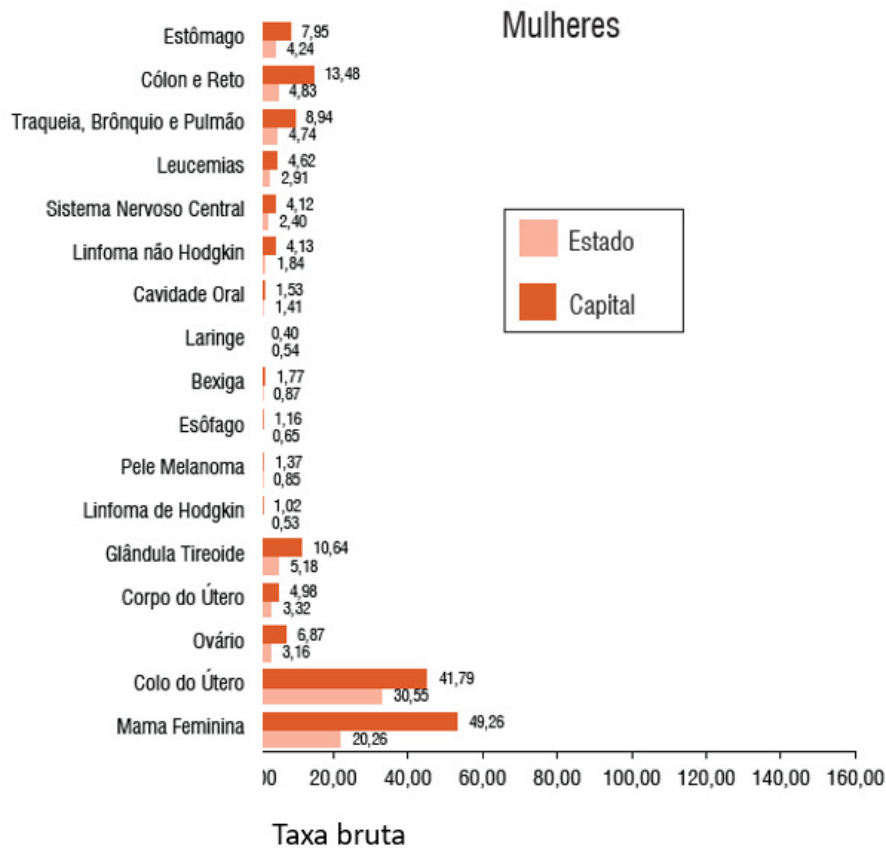
	Localização Primária	Casos	%
<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
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

**Figura 3:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo feminino, exceto pele não melanoma. (Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil), (Adaptado de: INCA, 2017).

Nascimento *et al.*, (2018) buscou identificar a prevalência da infecção por HPV em comunidade quilombolas do estado do Maranhão. Identificou-se uma prevalência de 12,6% (50/395) entre as mulheres analisadas. A maior prevalência do HPV foi obtida entre mulheres com diagnóstico de lesões intra-epiteliais de alto grau (42,0%). Além disso, identificou-se os tipos 68 (26,0%), 58 e 52 (20,0%), 31 (10,0%) e 62 (8,0%) como os mais prevalentes tipos de HPV entre mulheres quilombolas. A evidência da presença do HPV 68 e 58 nesta população já havia sido registrada no Maranhão por Batista *et al.*, (2014) registrando-se a evidência da relação do HPV com anormalidades citológicas.

No Maranhão, estimou-se que para o ano de 2016 o câncer do colo do útero seria o mais comum, com mais de 28,57 novos casos para cada 100 mil mulheres (PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016). Para o biênio 2018-2019 são esperados

1.090 novos casos (INCA, 2017). Ainda de acordo com o INCA (2017) as taxas brutas de incidência do câncer do colo do útero estão concentradas na capital São Luís (41,7\100 mil habitantes), comparado com o Estado do Maranhão (30,55\100 mil habitantes) (Figura 4).



**Figura 4.** Taxas brutas de incidências estimadas para 2018 por sexo, segundo Estado e capital. (Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil), (Adaptado de: INCA, 2017).

Em São Luís, estimativas para 2018-2019 indicam 240 novos casos de câncer do colo do útero (INCA, 2017). Esta variação na distribuição do câncer cervical nas regiões brasileiras pode ser explicada pela grande extensão territorial do país e pelas desigualdades sociais entre as diferentes regiões. Taxas reduzidas de incidência e mortalidade são encontradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste, onde as mulheres são essencialmente urbanas e possuem melhor acesso a serviços de saúde de qualidade. As regiões Norte e Nordeste apresentam os menores índices de desenvolvimento humano (IDH) do país, com condições socioeconômicas precárias e reduzido acesso da população aos serviços de saúde (VALE *et al.*, 2016).

## 2.2. Análise Histórica do Câncer do Colo do Útero e o HPV

As verrugas na pele e na região genital foram observadas inicialmente na Antiguidade por médicos gregos e romanos, e foram nomeadas de condiloma acuminado (do grego *kondilus* = côneo; do latim *acuminare* = pontudo) (CAMARA *et al.*, 2008).

No final do século XIX foi registrada a natureza infecciosa das verrugas. Em 1891, Joseph F. Payne, em Londres, publicou um artigo clássico: *On the contagiousness of common warts*, onde descreve o desenvolvimento, por auto inoculação, de verrugas em seu próprio polegar, depois de ter raspado a superfície de uma lesão verrucosa de uma criança. Pouco tempo depois, em 1894, em trabalhos independentes, C. Licht e Gaston Variot, também demonstraram o caráter infeccioso daquelas lesões, provocando o aparecimento de verrugas em voluntários inoculados experimentalmente com macerados de tecido verrucoso (CAMARA *et al.*, 2008).

No início do século XX iniciaram-se experimentos visando identificar a natureza das verrugas, sendo o pesquisador G. Ciuffo o primeiro a suspeitar que as verrugas eram causadas por vírus. Em seu experimento, usou um filtrado, que havia sido passado em poros incapazes de reter partículas com dimensões compatíveis com as dos vírus, para auto inocular-se e produziu verrugas na mão (CAMARA *et al.*, 2008).

Em 1933, Richard E. Shope realizou experimentos utilizando filtrado livre de células de verrugas de coelhos selvagens e inoculou-os em coelhos domésticos saudáveis, levando ao desenvolvimento das verrugas. Posteriormente, o desenvolvimento da microscopia eletrônica e do cultivo de células possibilitou um grande avanço na Virologia, permitindo a visualização e identificação do Papilomavírus como agente etiológico das verrugas (ZUR HAUSEN, 1989).

Entre 1974 e 1976, pesquisadores começaram a postular sobre o possível papel do HPV na carcinogênese cervical. Em 1976, Meisels e Fortin publicaram artigos reportando que o aparecimento de coilócitos em esfregaços de células cervicais poderiam indicar a presença de infecção pelo HPV. Também foi possível demonstrar a heterogeneidade entre a família Papillomavirus, e o subsequente isolamento de tipos específicos de HPV a partir de verrugas genitais e papilomas de laringe (ZUR HAUSEN *et al.*, 1989; CAMARA *et al.*, 2008).

Em 1976, Harald Zur Hausen publicou a hipótese de que o HPV estaria associado ao câncer cervical. Ele também foi o responsável por identificar dois tipos de HPV de biópsias de câncer cervical, sendo eles o HPV 16 e 18, e iniciando a rápida expansão nesta área, levando ao desenvolvimento de novos experimentos visando explicar o papel do HPV na carcinogênese cervical (ZUR HAUSEN *et al.*, 2002). A expressão de genes virais específicos (como E6 e E7) foram observados em linhagens celulares de câncer cervical, acreditando-se que estariam envolvidos na integração do genoma viral e a imortalização do vírus na célula (ZUR HAUSEN *et al.*, 2002).

Nos posteriores 14 anos resultou-se no melhor entendimento sobre a função dos oncogenes virais e o conhecimento sobre a história natural da infecção pelo HPV. Harald Zur Hausen foi o principal pesquisador no ramo do HPV, desenvolvendo os principais estudos sobre o vírus na progressão do câncer cervical e, por isso, recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2008 (ZUR HAUSEN *et al.*, 2002; CAMARA *et al.*, 2008).

### **2.3. Aspectos clínicos associados ao HPV e Câncer do Colo do Útero**

O câncer do colo do útero é caracterizada por um desenvolvimento lento, podendo apresentar sintomas na fase inicial como sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, corrimento vaginal de cor escura e mal cheiro (RODRIGUES *et al.*, 2016). Em estágios avançados pode apresentar massa palpável no colo do útero, obstrução de vias urinárias e intestino, dores lombares e abdominais, perda de apetite e de peso (RODRIGUES *et al.*, 2016). Ela evolui a partir de uma lesão pré-maligna não invasiva podendo adquirir potencial invasor em um período de 5 a 6 anos (MEZEI *et al.*, 2017).

O HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo mundo. Apresentando tropismo para células epiteliais, infectando células da pele e da mucosa genital e oral, através do contato direto com micro lesões presentes na pele ou em mucosas ( ZUR HAUSEN, 2009; PINIDIS *et al.*, 2016).

Outras formas incluem a transmissão vertical, da mãe para o bebê no momento do parto, podendo levar ao desenvolvimento de lesões anogenitais e a

papilomatose respiratória, bem como a auto inoculação (RAMANAKUMAR *et al.*, 2016).

Na maioria da população, a infecção pelo vírus HPV se apresenta de forma transitória, sendo eliminada pelo sistema imune sem que haja o desenvolvimento de manifestações clínicas (ZUR HAUSEN, 2002, ZUR HAUSEN, 2009). Em infecções persistentes, o vírus pode levar a alterações celulares que podem progredir para lesões malignas (ARENDS; BUCKLEY; WELLS, 1998).

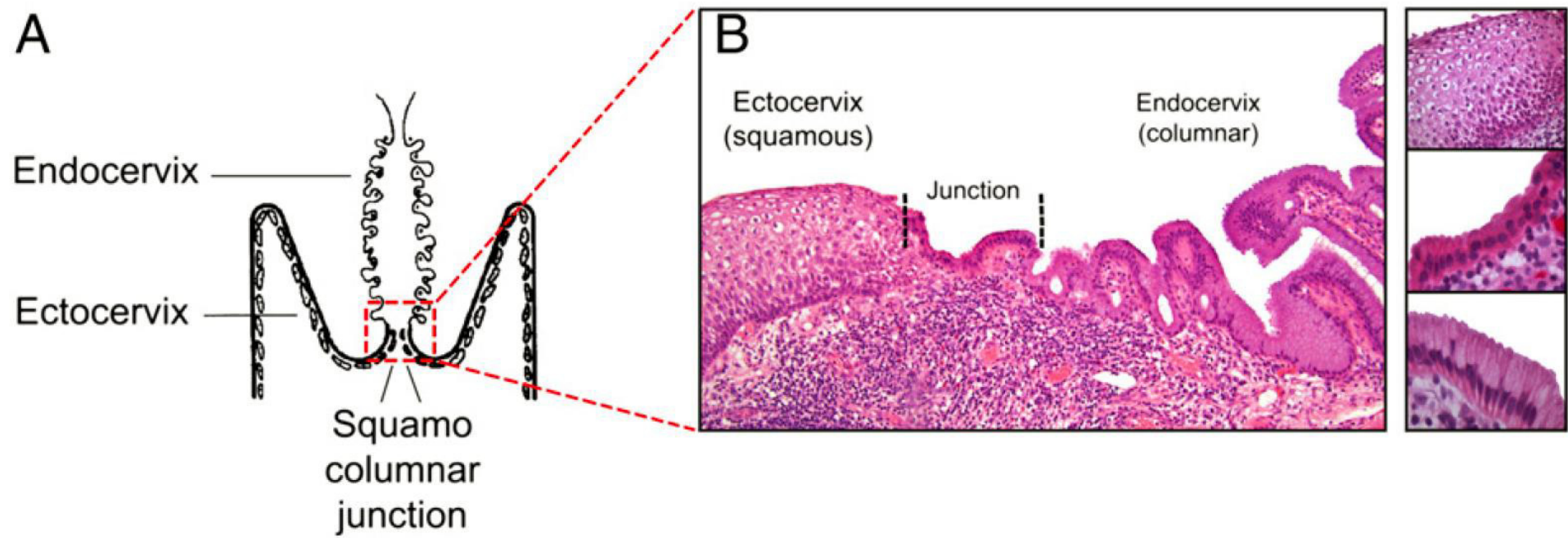
A literatura mostra que a infecção pelo HPV seja causa necessária, mas não suficiente para o estabelecimento do câncer do colo do útero (ZUR HAUSEN, 2009), sendo necessária a associação de outros cofatores para o desenvolvimento e progressão para o câncer. Dentre os principais cofatores estão aqueles associados ao comportamento sexual e hábitos de vida. São eles: o início sexual precoce, multiplicidade de parceiros sexuais, multiparidade, uso prolongado de anticoncepcionais, tabagismo e histórico de infecções sexualmente transmissíveis (VEO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016). Os fatores associados ao HPV incluem: infecção única ou múltipla, subtipos encontrados e carga viral no epitélio infectado (CAO *et al.*, 2016; GRABOWSKI *et al.*, 2016).

#### **2.4. Aspectos Histológicos do Câncer do Colo do Útero**

O colo do útero apresenta formato cilíndrico e é formado por três regiões distintas, sendo elas: a endocérvice, ectocérvice e zona de transformação dos epitélios (ZT). A endocérvice compreende a parte interna e é coberto por uma camada única de células cilíndricas produtoras de muco. A ectocérvice compreende a parte externa, mantém contato com a vagina e é revestida por camadas de células epiteliais escamosas estratificada. Entre estes dois epitélios encontra-se a junção escamo-colunar (JEC), podendo variar em tamanho e formato, dependendo da idade da mulher, paridade e estado hormonal (BARTOLI *et al.*, 1991; DIZ; MEDEIROS, 2009). Esta região possui margens bem definidas pela diferença de altura entre os epitélios colunar e escamoso (HERFS *et al.*, 2012) (Figura 2). Na infância e no período pós-menopausa, geralmente, a JEC situa-se dentro do canal cervical. Já no período reprodutivo da mulher, geralmente ela se situa na ectocérvice.



Ao longo da vida da mulher, devido a 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. Assim, células subcilíndricas de reserva se transformam em células mais adaptadas (escamosas), dando origem a um novo epitélio, situado entre os dois epitélios originais, chamado de zona de transformação (Figura 5) (DIZ; MEDEIROS, 2009; HERFS *et al.*, 2012).



**Figura 5.** (A) Representação esquemática do colo do útero humano. (B) Corte histológico do colo. (Adaptado de: HERFS *et al*, 2012).

As células basais da zona de transição possuem grande habilidade de diferenciação, permitindo a elevada taxa de produção de partículas virais durante a infecção pelo HPV (ZUR HAUSEN, 2000). A maioria das mulheres com câncer cervical invasivo apresenta lesão visível ao exame citológico e se forma geralmente na região da zona de transição escamo-colunar (DIZ; MEDEIROS, 2009; HERFS *et al.*, 2012).

Os tumores cervicais são originados de células do epitélio da zona de transformação, podendo apresentar características de célula escamosa, glandular ou padrão misto. Em vista disso, os principais tipos de câncer do colo do útero são os carcinomas de células escamosas e os adenocarcinomas (HERFS *et al.*, 2012).

O câncer do colo do útero apresenta uma variedade de tipos histológicos, sendo o carcinoma de células escamosas responsáveis por até 95% dos casos, seguido pelo adenocarcinoma e o carcinoma adenoescamoso (HALLE *et al.*, 2017).

O carcinoma adenoescamoso exibe diferenciação glandular e escamosa e possui prognóstico pior em relação ao carcinoma de célula escamosa e adenocarcinomas (DIZ; MEDEIROS, 2009). A presença de adenocarcinomas está associado a maiores chances de falso negativos no exame de citologia oncológica quando comparado com carcinoma de célula escamosa (HERFS *et al.*, 2012). Além disso, pesquisas relacionadas apontam que as infecções por HPV 18 são mais associadas ao adenocarcinoma do que as infecções por HPV 16 (DE BOER *et al.*, 2005). Justifica este fato devido a diferenças no potencial oncogênico entre os tipos de HPV (ALTEKRUSE *et al.*, 2003).

## **2.5. Estadiamento do Câncer do Colo do Útero**

Para identificar o grau de avanço do câncer e utilizado o estadiamento da doença. Ele é realizado de acordo com a classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) ou pelo sistema FIGO da *International Federation of Gynecology and Obstetrics*. Além de fornecer informações importantes aos profissionais da saúde para determinar o tratamento adequado para cada caso, também permite prever os possíveis cursos de evolução do tumor (ZIGRAS *et al.*, 2017).

O sistema FIGO é baseado no resultado de exames clínicos não-cirúrgicos para análise da extensão da doença, entre eles o tamanho e extensão do tumor para a mucosa vaginal (RAPOSO; OLIVEIRA, 2009; VALE *et al.*, 2016). Apesar de ser um importante fator para o prognóstico da doença, o comprometimento linfonodal não é analisado pelo estadiamento FIGO pela impossibilidade de detecção. Segundo a FIGO, o estágio tumoral é dividido em: I (Ia, Ia1, Ia2, Ib, Ib1 ou Ib2) quando o tumor limita-se ao colo do útero; II (IIa IIb) tumor invadindo terço superior da vagina e/ou parcialmente os paramétricos; III (IIIa e IIIb) tumor invadindo terço inferior da vagina e/ou totalmente os paramétricos; IV (IVa e IVb), tumor invadindo estruturas extra-uterinas e/ou metástases a distância (CASTLE *et al.*, 2007).

Por essa razão, o estadiamento cirúrgico tem se estabelecido por identificar estágios avançados da doença, quando comparados com o estadiamento clínico (CAMPOS *et al.*, 2017; ZIGRAS *et al.*, 2017). O sistema TNM leva em consideração o tamanho do tumor (T), a disseminação do tumor para linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases em outras partes do corpo (M). (Figura 6).

GRUPOS DE ESTADIAMENTO			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IA	T1a	N0	M0
Estádio IA1	T1a1	N0	M0
Estádio IA2	T1a2	N0	M0
Estádio IB	T1b	N0	M0
Estádio IB1	T1b1	N0	M0
Estádio IB2	T1b2	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio IIA	T2a	N0	M0
Estádio IIB	T2b	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T3a	N0	M0
Estádio IIIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N1	M0
	T3b	Qualquer N	M0
Estádio IVA	T4	Qualquer N	M0
Estádio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

**Figura 6:** Estadiamento TNM para identificação do grau de extensão do câncer adaptado de TNM da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (WITTEKIND; ASSAMURA; SOBIN, 2014).

As alternativas atuais têm possibilitado a melhora no estadiamento, com o emprego de métodos de imagem – tomografia computadorizada (CT), ressonância

magnética (RM) e *positron emission tomography* (PET). Todos os métodos de imagem mostram elevada acurácia para avaliação do tamanho do tumor, detecção do envolvimento do paramétrio e vagina, e de gânglios com volume aumentado (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Entretanto, a detecção de metástases em gânglios com volume normal e mesmo a avaliação correta da disseminação da doença na cavidade abdominal só podem ser efetuadas, atualmente, pela inspeção intraoperatória e histopatológica, portanto, o estadiamento cirúrgico rotineiro para tumores localmente avançados tem sido adotado (HALLE *et al.*, 2017).

## 2.6. Rastreio do Câncer do Colo do Útero

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a realização do exame de Papanicolaou no período de três em três anos, após dois exames anuais consecutivos negativos para o rastreio de lesões precursoras do câncer do colo do útero. Neste teste são observadas alterações celulares mediante análise microscópica de células cervicais em esfregaço citológico corado pela técnica de Papanicolaou (NAYAR; WILBUR; SOLOMON, 2008; PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

O INCA segue os preceitos da OMS, contudo no Brasil, considerando a grande extensão territorial, o acesso ao exame de Papanicolaou pode ser dificultado e promover a detecção de diagnósticos tardios de câncer do colo do útero (PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016). No Brasil, o exame é realizado de maneira não padronizada e, conseqüentemente, metade dos diagnósticos positivos são detectados em estágios avançados, mantendo as altas taxas de mortalidade (GASPERIN; BOING; RUPEK, 2011). A evolução de exame de Papanicolaou favoreceu a melhoria do diagnóstico citológico ao longo dos anos. No intuito de rastrear possíveis lesões precursoras do câncer do colo do útero, vários sistemas de classificação e nomenclatura foram desenvolvidos baseando-se em diferenças morfológicas e histológicas.

A classificação citológica de Papanicolaou foi desenvolvida em 1941 e preocupava-se apenas com aspectos histológicos das lesões. Posteriormente, no Congresso Mundial da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

realizado em 1952 criou-se um sistema de classificação baseado no termo “displasia”, podendo ser ela leve, moderada ou acentuada. Atualmente, esta classificação não vem sendo mais utilizada.

Em 1967, as displasias foram classificadas como um processo de proliferação neoplásica intraepitelial e introduziu o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e as agrupou em graus 1, 2 e 3, sendo NIC 1 classificada como baixo grau (atinge células maduras) e NIC 2 e NIC 3 de alto grau (neoplasia de células imaturas) (PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016). Esta classificação é mais utilizada para laudos histológicos.

Já em 2001, foi criada uma nomenclatura que substituiu o termo neoplasia por lesão intraepitelial, separando as lesões com potencial morfológico de progressão para neoplasia daquelas mais relacionadas com o efeito citopático viral, com potencial regressivo ou de persistência. Além disso, na classificação Bethesda houve a inclusão de diagnóstico citomorfológico sugestivo de HPV devido às fortes evidências do envolvimento desse vírus na carcinogênese dessas lesões e o diagnóstico citológico passa a ser diferenciado para as células escamosas e glandulares.

Dentre as anormalidades de células epiteliais escamosas, podem ser: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US); lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) que inclui HPV/displasia leve/NIC1 e; lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) que compreende displasia moderada/grave, NIC II, NIC III e carcinoma *in situ* (PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

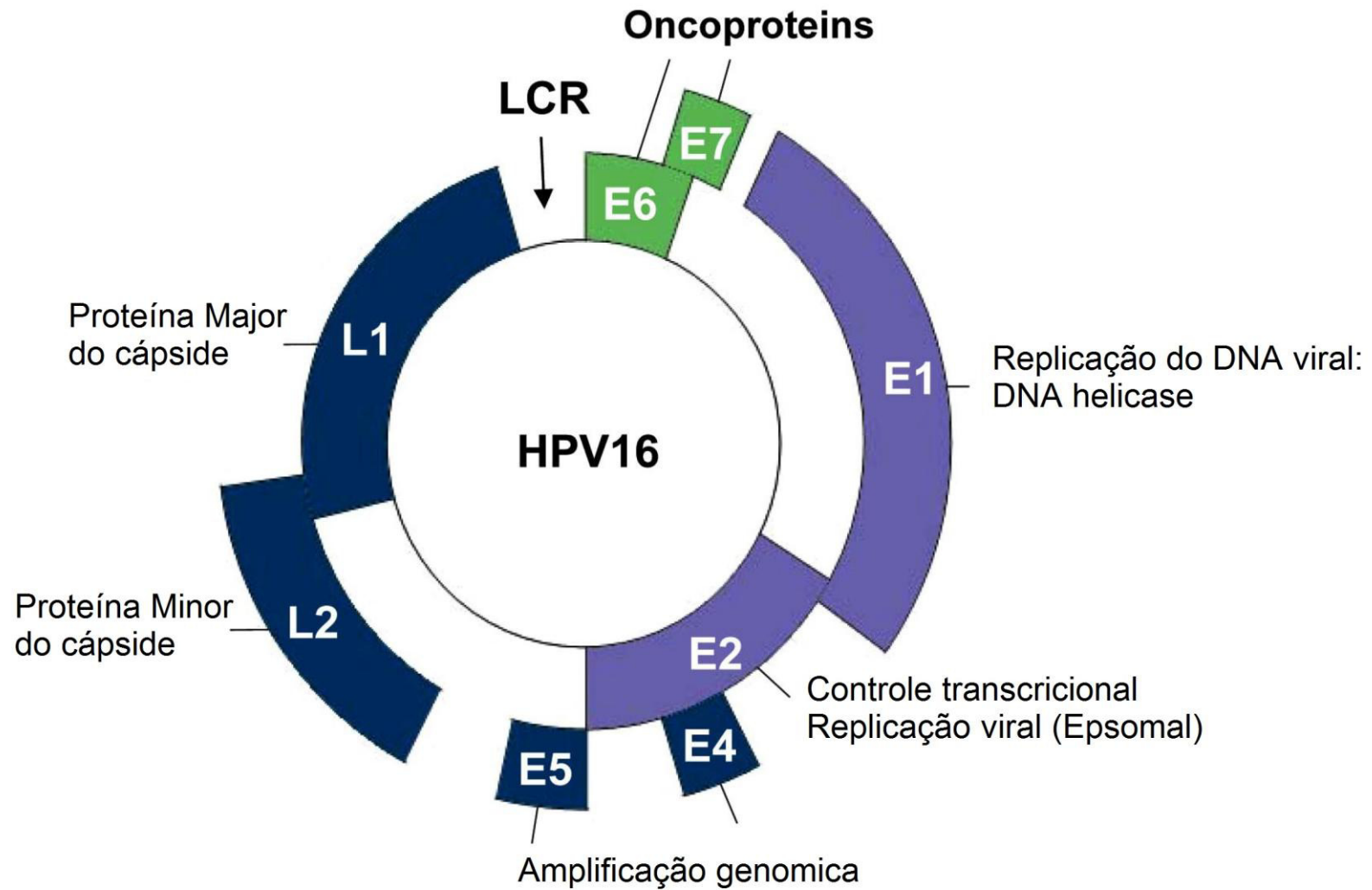
Para as anormalidades de células epiteliais glandulares, podem ser: células endocervicais, endometriais ou glandulares sem outras especificações (SOE); células atípicas endocervicais ou glandulares possivelmente neoplásicas; adenocarcinoma endocervical *in situ*; ou adenocarcinoma endocervical, endometrial, extrauterino ou SOE.

O resultado mais comum encontrado entre as anormalidades em citologias cervicais são as atipias escamosas celulares (ASC), sendo que o percentual aceitável para ASC é inferior a 5%, considerando que tal achado pode ter significado indeterminado ou favorecer o desenvolvimento de lesões de alto grau (MOSCICKI *et al.*, 2012; WENTZENSEN *et al.*, 2016).

Em países desenvolvidos, a reação de PCR é utilizada para o rastreio de HPV, seguido de citologia e biópsia para estudo histopatológico (HALLE *et al.*, 2017).

## 2.7. Aspectos da Biologia do Papilomavirus Humano (HPV)

O HPV consiste de um grupo heterogêneo de vírus não envelopado, com dupla fita de DNA circular e 8000 pares de bases nucleotídicas (TJALMA *et al.*, 2005; ZUR HAUSEN, 2009). Ele possui diâmetro de 55 nm e capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros composto por duas proteínas estruturais L1 e L2 (Figura 7) (BURD, 2003; D'ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2011; PINIDIS *et al.*, 2016).



**Figura 7:** Representação esquemática do genoma do HPV. (Adaptado de: D'ABRAMO; ARCHAMBAULTI, 2011).



O genoma é formado por duas regiões principais, sendo elas uma região aberta de leitura (do inglês, *Open Reading Frames* ou ORF), onde estão localizados os genes codificantes de proteínas, atuando em funções como ativação de transcrição, transformação, replicação e formação de proteínas estruturais; uma região longa controladora (do inglês, *Long Control Region* ou LCR), que contém sequências que controlam a transcrição e replicação viral (MUÑOZ *et al.*, 2006; ZUR HAUSEN, 2009; PINIDIS *et al.*, 2016).

As ORFs apresentam duas regiões, sendo elas: região E (E = *Early*, precoce) onde estão localizados genes que são expressos na fase inicial do ciclo de vida do vírus, denominadas: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e a região L (L = *Late*, tardio) que são expressa na fase tardia de infecção, denominadas: L1 e L2 (FELLER *et al.*, 2009; BIRYUKOV; MEYERS, 2015). A região controladora LCR possui regiões promotoras, sítios de ligação de fatores de transcrição e a região de origem de replicação do vírus (FELLER *et al.*, 2009; BIRYUKOV; MEYERS, 2015; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

Dentre os genes expressos primeiramente no ciclo de vida do HPV estão: E1 e E2 que são responsáveis por se ligar e recrutar proteínas para sítios de início de replicação e regular a expressão de outros genes (ZUR HAUSEN, 2002; SCHIFFMAN *et al.*, 2016; HARDEN *et al.*, 2017). A função dos genes E4 e E5 não está completamente estabelecida, mas acredita-se que eles atuem na modulação e amplificação do DNA do HPV e a expressão de genes estruturais, bem como a saída do vírus da superfície do epitélio (GALLOWAY; LAIMINS, 2016; HOFFMAN *et al.*, 2016).

Durante a infecção, os genes E6 e E7 possuem papel importante na proliferação celular por atuar sob fatores de regulação do ciclo celular. Em HPVs de alto risco, o gene E6 pode induzir a degradação da proteína supressora de tumor p53 e o gene E7 pode se ligar e inativar a proteína supressora retinoblastoma (pRB) e outras proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (DOORBAR *et al.*, 2016; ZACAPALA-GÓMEZ *et al.*, 2016; TOMMASINO, 2017). Por isso, E6 e E7 são genes fundamentais para a formação de tumores associados ao vírus HPV. Em tipos considerados de baixo risco, E6 e E7 participa da formação de tumores benignos, mas apresentam baixo potencial de malignização (GANGULY; PARIHAR, 2009; TOMMASINO, 2017).

Em HPVs de alto risco as proteínas E6 e E7 possuem maior afinidade por fatores reguladores do ciclo celular do que em HPVs de baixo risco e, por isso, causa o comprometimento dos mecanismos de regulação e sobrevivência da célula (SONGOCK; KIM; BODILY, 2016). Os genes expressos tardiamente no ciclo celular são L1 e L2, responsáveis pela incorporação do DNA viral e por codificar proteínas do capsídeo viral. O gene L1 codifica a maioria das proteínas do capsídeo, participando da montagem dos vírions. Proteínas produzidas por L2 atuam no transporte de proteínas L1 para o núcleo e no encapsulamento do DNA viral (GALLOWAY; LAIMINS, 2016; PINIDIS *et al.*, 2016).

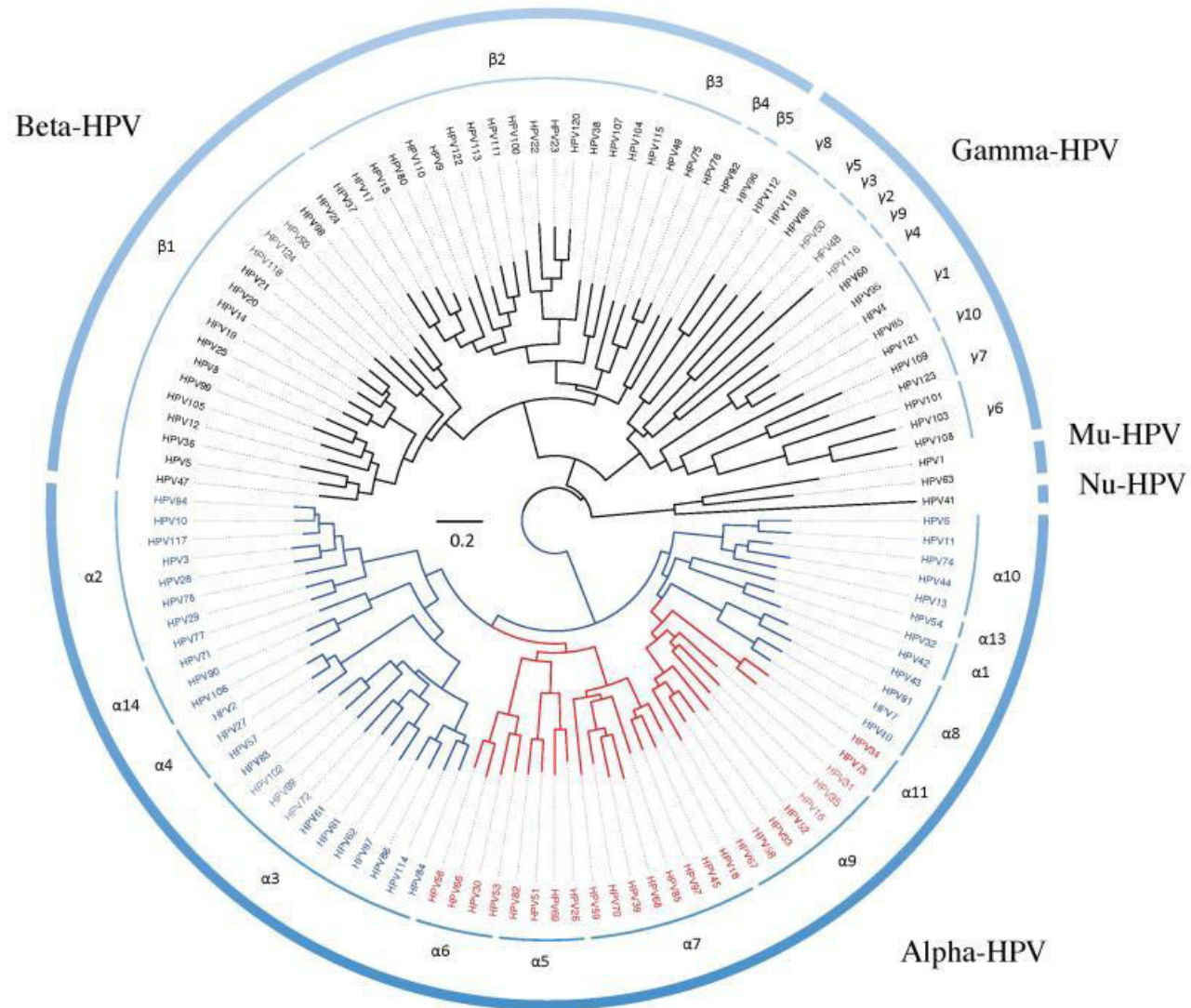
## 2.8. Classificação dos tipos de HPV

Os Papilomavírus humanos são divididos em cinco gêneros e classificados de acordo com diferenças na sequência de DNA (a partir de sequências do gene L1), devendo apresentar pelo menos 10% de diferenças de outros tipos (FELLER *et al.*, 2009; BANSAL; SINGH; RAI, 2016). Os tipos de HPV que infectam humanos são classificados em Alfa, Beta, Gama, Nu e Mu, sendo os gêneros Alfa, Beta e Gama os grupos mais representativos (HARARI; CHEN; BURK, 2015). No gênero alfa estão vírus que infectam a mucosa epitelial oral e genital; os vírus pertencentes ao gênero beta infectam principalmente a pele, levando desde o desenvolvimento de verrugas benignas até o câncer de células escamosas (MA *et al.*, 2014; ZACAPALA-GÓMEZ *et al.*, 2016).

Apesar de estarem divididos em diferentes gêneros, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) também classificou o HPV de acordo com seu potencial de desenvolver o câncer, podendo ser de baixo risco, alto risco ou de risco indeterminado. Dentre os tipos de baixo risco estão o HPV 6 e 11, associados ao desenvolvimento de verrugas nas mãos e outras lesões papilomatosas (CHEAH; LOOI, 1998; GANGULY; PARIHAR, 2009; ZUR HAUSEN, 2009). Dentre os tipos de alto risco oncogênico estão aqueles intimamente relacionados ao desenvolvimento do câncer e lesões precursoras, como os tipos HPV 16 e 18 (SONGOCK; KIM; BODILY, 2016; WENTZENSEN *et al.*, 2016). Os tipos de risco indeterminado são aqueles que não apresentam dados suficientes para uma classificação definitiva, como o HPV 26, 53, 54, 55, 61, 62, 66 E 73 (GRAVITT, 2011).

Os HPVs de alto risco pertencem ao gênero de alfapapilomavírus. A Figura 8 demonstra a árvore filogenética contendo a sequência de 170 tipos de Papilomavírus, baseados na análise da sequência de L1.

Além da classificação em família, gênero e espécie, os Papilomavírus são classificados em tipos e variantes (PISTA *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2016). Um tipo de HPV difere de outro quando apresenta, pelo 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% entre a região LCR (DE VILLIERS *et al.*, 2004; MARUŠIČ *et al.*, 2017).



**Figura 8:** Árvore filogenética do HPV. (Adaptado de: HARARI *et al.*, 2014).

## 2.9. Ciclo de Vida e Carcinogênese Mediada pelo HPV

O vírus HPV infecta células da camada basal do epitélio escamoso, que são células menos diferenciadas e que ainda conseguem se proliferar (LI *et al.*, 2016). A infecção se inicia quando o vírus entra na camada basal do epitélio através de microlesões encontradas nessas células (CHAUX *et al.*, 2013; BIRYUKOV; MEYERS, 2015; HONG; LAIMINS, 2016). Uma vez dentro da célula, o DNA do vírus é liberado do capsídeo e transportado para o núcleo, onde o DNA do HPV vai replicar e se manter na forma episossomal (cerca de 100 cópias por célula) (FELLER *et al.*, 2009; HONG; LAIMINS, 2016).

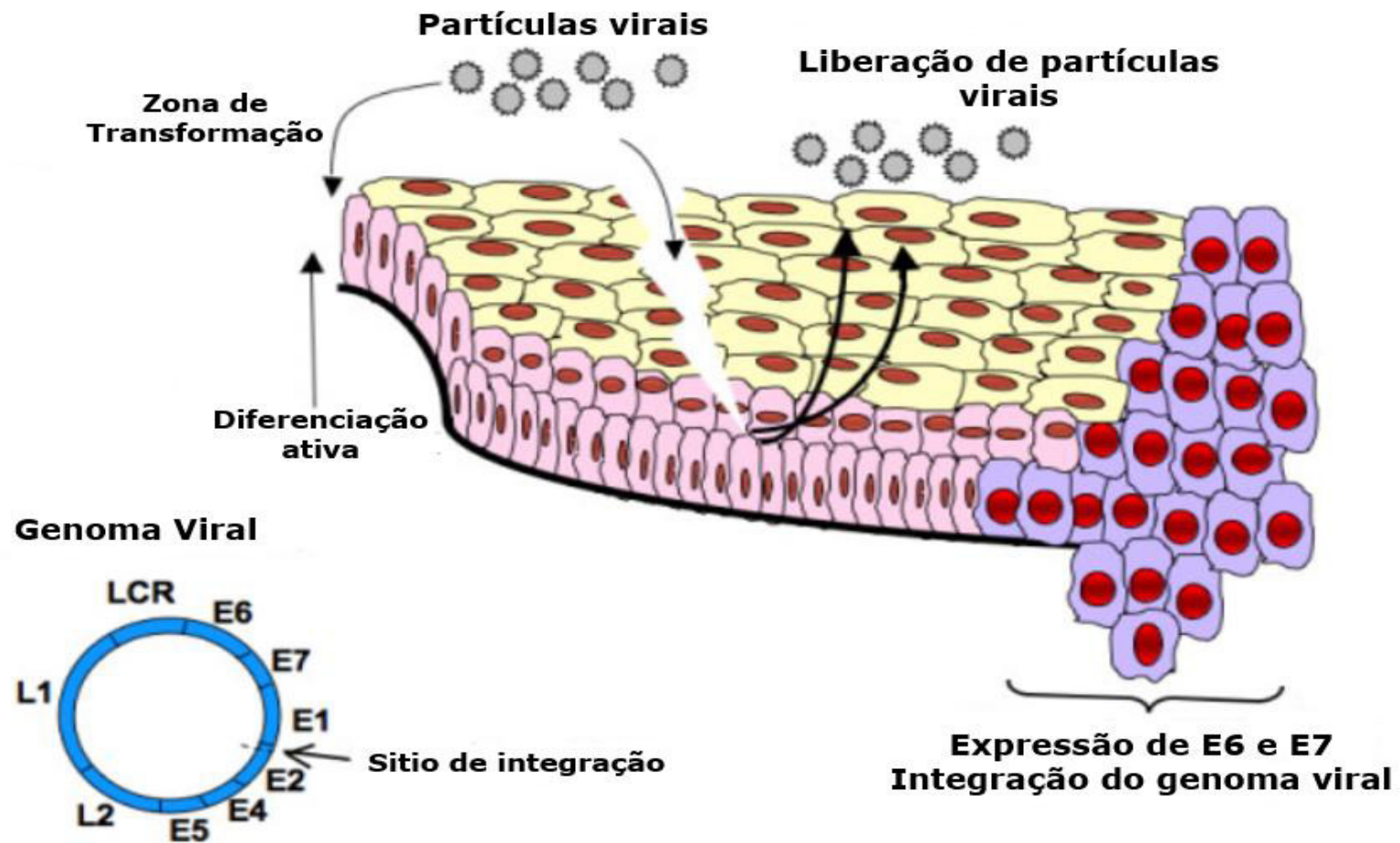
Nas células da camada basal, as proteínas E1 e E2 são expressas e regulam a transcrição de genes precoces para a produção de vírions (FELLER *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2010; SPIESS *et al.*, 2016). Não se sabe ao certo porque o HPV é capaz de infectar somente células da camada basal do epitélio escamoso, mas acredita-se que esteja relacionado a receptores restritos a essas células. Depois destas células se dividirem, E2 regula a distribuição do DNA viral para as células filhas (HONG; LAIMINS, 2016; SPIESS *et al.*, 2016).

Com a maturação das células suprabasais, o ciclo do HPV progride e passa a expressar proteínas de E6 e E7 (WOODMAN *et al.*, 2007; BANSAL; SINGH; RAI, 2016). A proteína E6 tem o papel de prevenir que a célula entre em apoptose (o que normalmente ocorre em resposta a infecção viral); e E7 consegue ativar mecanismos de replicação celular, levando a célula a entrar na fase S do ciclo celular, deixando assim a maquinaria de replicação celular disponível para a replicação do DNA viral (WOODMAN *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2010a; SPIESS *et al.*, 2016).

A produção de E1 e E2 conduz ao aumento da amplificação do genoma do HPV paralelamente aos estágios de maturação de células epiteliais. Eventualmente, a partir da expressão de proteínas L1 e L2, os vírus são formados e conseguem escapar das células epiteliais (FELLER *et al.*, 2009; ZUR HAUSEN, 2009; GRAVITT, 2011).

O mecanismo pelo qual o HPV leva a transformação maligna está associada tanto a carga viral, ao sítio e persistência da infecção, e a interação dos oncogenes virais E6 e E7, que são transcritos ativamente em células infectadas pelo vírus (ZUR

HAUSEN, 2009; DOORBAR, 2016). Eles são capazes de estimular o crescimento celular e, assim, contribuir para a imortalização das células (Figura 9) (FELLER *et al.*, 2009; WALHART, 2015; HONG; LAIMINS, 2016).



**Figura 9:** Esquema representativo do mecanismo de infecção do HPV no epitélio cervical. (Adaptado de: PEREZ-PLASENCIA *et al.*, 2008).

Estudos indicam que o gene E6 interage com a proteína p53, enquanto E7 interage com pRB (retinoblastoma) para bloquear a atividade dessas proteínas supressoras de tumor (WOODMAN *et al.*, 2007; BANSAL; SINGH; RAI, 2016). A região de E6 no DNA do HPV codifica uma proteína que age diretamente sobre proteínas supressoras de tumor, principalmente a p53 (THOMAS; PIM; BANKS, 1999).

A proteína p53 atua como regulador negativo de controle do ciclo celular e sua inibição pode levar a proliferação e desenvolvimento anormal da célula (SOUTO, 2005; WALHART, 2015; DOORBAR, 2016). Em resposta a danos na célula, a p53 pode desencadear o processo de apoptose para destruir células defeituosas e impedir que elas sejam replicadas (FERRAZ *et al.*, 2012; ANACKER; MOODY, 2016). Na infecção pelo HPV, a proteína E6 consegue se ligar a proteína E6AP e formar um complexo ubiquitina-quinase, e esse complexo leva a ubiquitinação de p53 seguido por sua degradação por um complexo proteossômico (FERRAZ *et al.*, 2012; ANACKER; MOODY, 2016). Com isso, vários eventos deletérios podem ocorrer dentro da célula, mas ainda assim essas células conseguirão sobreviver e acumular mutações em uma taxa maior do que o normal e causando, conseqüentemente, a ausência de sinalização de apoptose e imortalização da célula (ZUR HAUSEN, 2000; FELLER *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2012; ANACKER; MOODY, 2016).

A função principal do gene E7 é desregular o ciclo celular da célula infectada, induzindo a célula a sair da fase G<sub>0</sub> para a fase G<sub>1</sub> e S (FERRAZ *et al.*, 2012; ANACKER; MOODY, 2016; HONG; LAIMINS, 2016). E7 é uma proteína que irá se ligar a proteína retinoblastoma (RB), que por sua vez é supressora tumoral e inibe a proliferação celular em resposta a sinais intra e extracelulares (BANSAL; SINGH; RAI, 2016). Normalmente a pRB encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F, responsável por controlar a expressão de outros genes envolvidos no ciclo celular, mas que mantém seu domínio de ativação da transcrição bloqueado quando ligado a pRB (FERRAZ *et al.*, 2012; WALHART, 2015).

Ao degradar a proteína pRB ocorre a liberação de E2F, permitindo-lhe estimular a transcrição dos genes que estavam sendo reprimidos, entre eles a proteína p16. A proteína p16 é uma CDK (Cyclin-dependent kinases – quinases dependentes de cíclicas) que inibe a fosforilação de pRB, mantendo-a ativa e ligada ao fator de transcrição E2F, assim, sendo controlada pela pRB por feedback



negativo (SOUTO, 2005; WOODMAN *et al.*, 2007). Ou seja, a degradação de pRB por E7 resulta em um aumento na expressão de p16 nas células infectadas (RIVOIRE *et al.*, 2001; SOUTO, 2005).

A degradação de proteínas celulares associadas ao ciclo celular pelas proteínas virais compromete a integridade do DNA replicado, causando instabilidade no DNA da célula e a proliferação anormal dessas células, favorecendo o desenvolvimento do tumor (WOODMAN *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2010a; FERRAZ *et al.*, 2012).

## 2.10. Variações Intratipo de HPV

Apesar da relação entre os diferentes tipos de HPV e o desenvolvimento do câncer estar bem estabelecido, evidências sugerem que variações genéticas entre um mesmo tipo viral podem influenciar no potencial de infecção, na persistência viral, no desenvolvimento de lesões precursoras e na progressão para o câncer invasivo (BERNARD, 2005; TAMEGÃO-LOPES *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015; VIDAL *et al.*, 2016). O HPV apresenta variações intratipo preservadas entre diferentes regiões geográficas e sua distribuição global parece estar dependente da população. A filogenia do HPV reflete divergências evolucionárias associadas a padrões de migração humana, sugerindo que as variantes diversificaram em consonância com a expansão humana global (ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 2015).

As variantes diferem entre si em até 2% em regiões codificantes e 5% em regiões não codificantes do genoma viral, podendo levar a alterações nas funções das mesmas, como por exemplo na replicação e transcrição do DNA viral, imortalização e transformação celular (BERNARD, 2005). Com isso, podem levar a modificações que resultem em diferentes resultados clínicos.

As regiões LCR e E6 do genoma do HPV são as mais amplamente estudadas para análise de variações intratipo. A região LCR por ser formada por regiões promotoras e importantes sítios de ligação para fatores de ligação celulares e os genes codificantes das proteínas E6 e E7 por sua habilidade de inativação de proteínas de controle celular (ZUNA *et al.*, 2009).

Para um papilomavírus ser reconhecido como um novo tipo pelo centro de referência em HPV (<http://www.hpvcenter.se/>), o genoma completo deve ser clonado

e a sequência do gene L1 deve possuir até 90% de similaridade com tipos de HPV previamente classificados. Isolados do mesmo tipo de HPV são chamadas de variantes quando a sequência de nucleotídeos de L1 difere de outro tipo caracterizado em menos de 10% (KUKIMOTO *et al.*, 2015).

A classificação baseada em L1 agrupa corretamente os grupos de HPV em espécie e gênero mesmo quando ocorre incongruências na árvore filogenética inferidas a partir de diferentes regiões de ORF.

Entretanto, nem sempre uma única região/gene apresenta informações suficientes para distinguir variantes de HPV que apresentam ambiguidades. Uma nova nomenclatura tem sido implementada utilizando-se o genoma completo. Variantes são definidas por uma sequência de nucleotídeos com diferença de aproximadamente 1 – 10% entre duas ou mais variantes do mesmo tipo. Similarmente, diferenças no genoma de 0.5-1% são utilizadas para definir sublinhagens. Cada linhagem de variante é classificada e nomeada com um valor alfanumérico (CHEN *et al.*, 2015; KUKIMOTO *et al.*, 2015).

Uma nomenclatura de linhagens e variantes permite investigadores classificar isolados baseado no número limitado de informações sobre sequências do genoma. Por haver distintos polimorfismos de único nucleotídeo dentro de uma mesma linhagem e sublinhagem, isto permite que pesquisadores possam classificar linhagens de HPV sem ter que fazer referência a posição específica de mudança de nucleotídeo.

## **2.11. Variantes de HPV 16 e o Câncer do Colo do Útero**

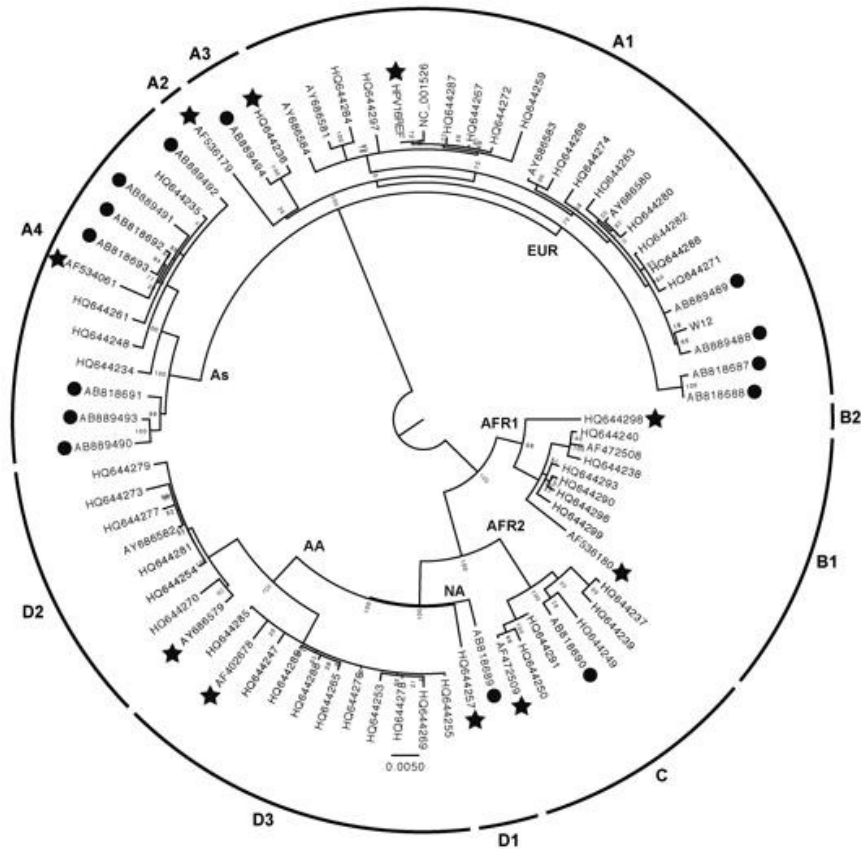
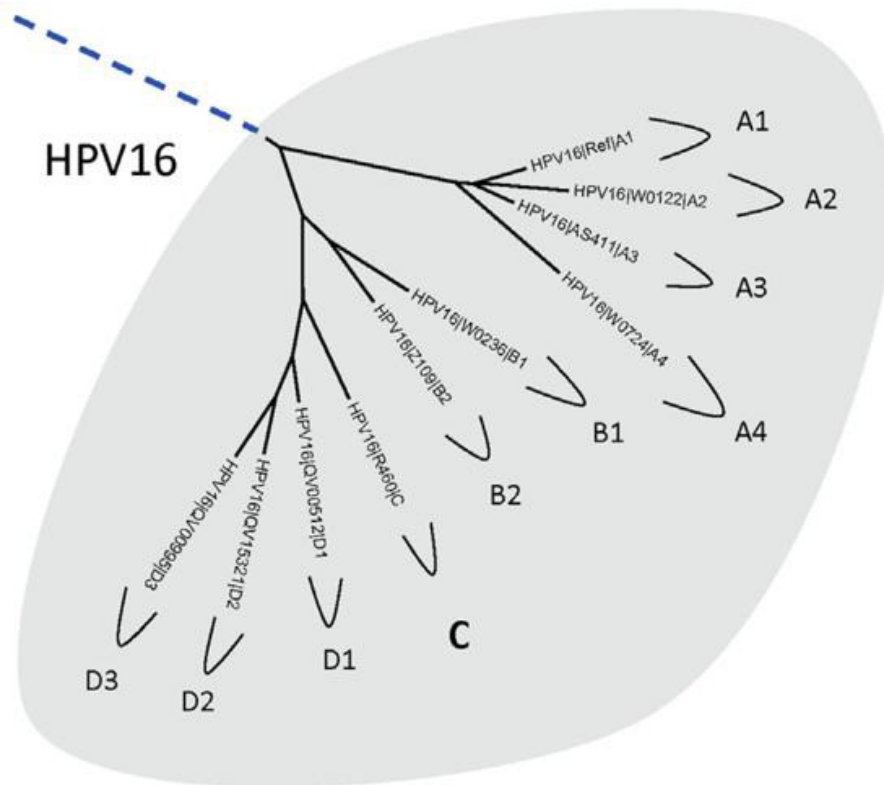
Devido a elevada prevalência do HPV 16 em casos de câncer do colo do útero, a associação entre o HPV16 e o câncer vem sendo estudado ao nível de variantes intratipo, e várias linhas de estudo tem atribuído um maior risco de câncer cervical invasivo a algumas linhagens do HPV 16.

As variantes de HPV 16 são classificadas em diferentes linhagens e sublinhagens, definidas por possuírem 1-10% e 0.5-1% de variação na sequência nucleotídica no genoma viral completo. O primeiro grande estudo mundial foi feito em 1993 por Ho *et al.*, (1993), que relatou que as variantes de HPV 16, baseadas

em sequências de LCR, podem ser agrupadas em cinco grandes linhagens: Europeu (EUR) (sendo esta definida como o protótipo), Asiático (As), Asiático-americano (AA), Africano 1 e Africano 2 (AFR1 e AFR2). O grupo Europeu (EUR) que incluem as linhagens E e As e o grupo Não Europeu (NE), que incluem as linhagens AFR1, AFR2, NA e AA. As linhagens não-europeias pertencentes ao grupo NE são apontadas como sendo mais patogênicas, em comparação com os isolados Europeus (EUR) (SICHERO *et al*, 2007; BURK *et*, 2013).

A classificação das variantes de HPV 16 realizada de acordo com Burk (2013), (Figura 10A) indica: variante A (previamente classificada como europeia-asiática), que inclui sublinhagens A1, A2, A3 (europeia, EUR), e A4 (asiático – As); variante B (Africana 1, AFR1), com as sublinhagens B1 e B2; variante C (Africana 2, AFR2); e variante D (América do Norte\Ásia-Americana, NA\AA), consistindo das sublinhagens D1 (NA), D2 (AA2), e D3 (AA1) (KUKIMOTO; MURAMATSU, 2015).

A árvore filogenética da sequência completa do genoma HPV16 (Figura 10B) consiste nos trabalhos de Burk *et al.*, (2013) e Kukimoto e Muramatsu, (2015).



**Figura 10: A)** Classificação atual das variantes de HPV 16. (Adaptado de BURK *et al*, 2013). **B)** Sequência completa da árvore filogenética do HPV16. (Adaptado de: KUKIMOTO; MURAMATSU, 2015).

Para o HPV 16, a variante A tem sido reportada por possuir reduzido risco de desenvolvimento do câncer cervical. A variante D está associada a um risco aumentado de NIC3 e o câncer, e também por ser mais frequentemente detectada em adenocarcinoma cervical do que em carcinoma de célula escamosa, sugerindo-se que a variante D também está frequentemente detectada em adenocarcinoma cervical do que em carcinoma de célula escamosa, sugerindo-se que a variante D apresenta comportamento biológico diferente de acordo com o tipo histológico infectado no epitélio cervical (XI *et al.*, 2007; ZUNA *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015).

Estudos também demonstram que as variantes de HPV 16 são distribuídas de maneira diferente ao longo de países e regiões, e que a ação de uma variante específica sobre a progressão do câncer cervical também pode variar em diferentes regiões. 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 por apresentar diferentes. 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 (VILLA *et al.*, 2000; SICHERO *et al.*, 2007; SCHIFFMAN *et al.*, 2010; GHEIT *et al.*, 2011; BURK; HARARI; CHEN, 2013). (Tabela 1).

**Tabela 1: Representação do genoma viral do HPV 16 e variantes com linhagens e sublinhagens.** (Adaptado de BURK; HARARI; CHEN; 2013).

Espécie	Tipo	Linhagem	Sublinhagem	Variante genoma ID	Referência no GenBank	Outros nomes
Alpha-9	HPV16	A	A1	Ref	K02718	European (E)
			A2	W0122	AF536179	European (E)
			A3	AS411	HQ644236	E
			A4	W0724	AF534061	Asian, E(As)
		B	B1	W0236	AF536180	African-1, Afr1a
			B2	Z109	HQ644298	African-1, Afr1b
		C		R460	AF472509	African-2, Afr2a
		D	D1	QV00512	HQ644257	North American (NA)1
			D2	QV15321	AY686579	Asian–American (AA)2
			D3	QV00995	AF402678	Asian–American (AA)1

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 (VILLA *et al.*, 2000; SCHIFFMAN *et al.*, 2010). Em populações Europeias geneticamente mais homogêneas, a linhagem predominante é do tipo EUR. Esta linhagem pode ser dividida em dois conjuntos de isolados, de acordo com o polimorfismo T350G, presente no gene E6, podendo levar 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 (GRODZKI *et al.*, 2006; GHEIT *et al.*, 2011).

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. Estes resultados contraditórios sugerem que a influência do polimorfismo T350G também pode estar condicionada a determinadas populações.

Comparativamente, existe uma forte evidência de que as variantes do grupo não europeu têm riscos mais elevados para o desenvolvimento do câncer, embora grande parte desta associação esteja relacionada especificamente ao subtipo AA (D)

(BERUMEN *et al*, 2001; BURK *et al*, 2003). Há também vários estudos que indicam que a variante AA, 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). No entanto, um estudo realizado na Indonésia, Suriname e Holanda em casos de câncer não reproduziram tal resultado (DE BOER *et al.*, 2005).

O elevado risco associado a variante AA 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 (CHAKRABARTI *et al.*, 2004; LICHTIG *et al.*, 2006). O protótipo E6 e suas variantes diferem: na sua afinidade com o cálcio, através da ligação E6-PB, na expressão de citoqueratinas em culturas organotípicas e no potencial de imortalização celular, avaliado por experimentos em uma linhagem de queratinócitos humanos.

Alguns estudos sugerem que a variante AA (D) é, em relação ao protótipo E (A), encontrada 20 vezes mais frequentemente em câncer cervicais diagnosticados nas Américas (BERUMEN *et al*, 2001), quando comparadas a mulheres sem câncer. Este último autor referiu-se em seu estudo a população mexicana. Foram observados que, comparativamente, a variante AA versus a variante E foi encontrada de forma estatisticamente significativa com maior frequência em pacientes de casos (AA = 23,2% [42 de 181]; E = 27,1% [49 de 181]) do que no grupo controle (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, provendo a variante AA um melhor mecanismo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro e um maior potencial oncogênico (DE ARAUJO SOUZA; SICHERO, MACIAG, 2009).

Em estudo conduzido por Richard *et al* (2010) foram comparadas as capacidades da proteína E6 do protótipo 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.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Analisar os tipos e variantes intratipo de HPV 16 em amostras de câncer cervical uterino de mulheres encaminhadas para do Hospital do Câncer da Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Maranhão e para o Hospital do Câncer Aldenora Bello em São Luís - Maranhão.

#### **3.2. Específicos**

- Descrever os dados sociodemográficos e clínicos da população do estudo;
- Determinar os genótipos de HPV encontrados;
- Descrever a prevalência do HPV na população estudada;
- Identificar a frequência das variantes de HPV 16 e suas respectivas linhagens e sublinhagem;
- Relacionar o HPV 16 e variantes intratipo com idade e características histopatológicas dos tumores cervicais;



## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo descritivo, prospectivo e transversal.

### **4.2. Período e Local do estudo**

O estudo foi realizado no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017, na Unidade de Assistência de Alta Complexidade (UNACON) do Hospital do Câncer da Secretaria de Estado de Saúde do Maranhão e no Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) do Hospital do Câncer Aldenora Bello, ambas habilitadas na Rede SUS.

### **4.3. População e Amostra**

A população do estudo foi composta por 120 mulheres com diagnóstico de câncer do colo do útero, atendidas nos locais supracitados.

#### *4.3.1. Critério de inclusão*

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

#### 4.3.2. Critério de exclusão

Mulheres que apresentaram indicação cirúrgica como tratamento inicial ou que apresentaram lesões pequenas, nas quais a realização da biópsia pudesse interferir no estadiamento. Também foram excluídas mulheres em tratamento psiquiátrico.

#### 4.4. Cálculo Amostral

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos para São Luís para neoplasias malignas do Colo do Útero é de 230 casos novos para 2016. Tendo em vista que se trata de uma amostra finita, ou seja, menor do que 100.000 indivíduos utilizamos a seguinte fórmula:

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

Legenda:

$n_0$  = intensidade da amostragem;

N = tamanho da amostra na população.

Sendo,  $n_0$  igual a:

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

Legenda:

$z(K)^2$  = valor na tabela do teste t-student com (n-1) graus de liberdade para o intervalo de confiança;

d= erro

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

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

Substituindo  $n_0$  na equação, teremos:

$$n = \frac{384,16}{1 + \frac{(384,16-1)}{230}} = 144,15$$

Logo, baseado nos valores de nossa população, são indicadas 144 amostras.

#### **4.5. Instrumento de coleta e avaliação de dados**

Inicialmente, as pacientes foram encaminhadas para atendimento ambulatorial no Serviço de Ginecologia Oncológica do Hospital do Câncer da Secretaria de Estado da Saúde do Maranhão (SES) e do Hospital do Câncer Aldenora Bello e convidadas a participar do estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Um questionário foi aplicado para coleta dos dados sociodemográficos, de reprodução e tabagismo (Anexo B).

Em seguida, ao exame ginecológico obteve-se fragmentos tumorais do colo do útero os quais foram acondicionadas em microtubos contendo 1 ml de RNA Later (Life Technologies) a 4°C e transportada em caixas térmicas, enviadas ao Laboratório Multiusuário localizado no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão da Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA. Após 24 horas, a amostra foi retirada do RNA later e armazenada em freezer a -80°C até o uso.

#### **4.6. Procedimentos experimentais**

##### *4.6.1. Extração do DNA*

A extração foi realizada a partir de tecido fresco e seguindo protocolo descrito pelo manual de uso do kit Dneasy Blood and Tissue (QIAGEN Ltda, UK). Os tecidos

tumorais foram seccionados com o auxílio de navalha estéril e pesados em até 25mg. Em seguida foram depositados em tubos de 2 mL, onde foram ressuspensos em 180µL de tampão de lise (ATL) e 20µL de Proteinase K. Os tubos foram incubados a 56°C em termomixer por 24h para a lise do tecido.

Foi adicionado 200µL de Tampão AL e esta foi homogeneizada no vortex por 15s. Em seguida, os tubos foram incubados a 90°C por 1 hora em termomixer. Em seguida, foi adicionado 200µL de Etanol P.A (Merck, BR) à amostra e esta foi novamente homogeneizada no vortex.

A mistura foi transferida para tubo contendo coluna de sílica (QIAamp MinElute) e centrifugada a 8.000rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, a coluna foi reposicionada em um novo tubo coletor, descartando-se o filtrado.

Iniciou-se as lavagens utilizando 500µL de Tampão de Lavagem 1 e centrifugou-se a 8.000rpm por 2 minutos. Novamente a coluna foi posicionada em um novo tubo coletor e descartou-se o filtrado. Foi adicionado 500µL de Tampão de Lavagem 2 e novamente centrifugado por 8.000rpm por 2 minutos. Novamente foi descartado o tubo coletor contendo o filtrado e a coluna foi reposicionada em tubo de 2mL com tampa. Foi adicionado 100µL de Tampão AE no centro da coluna a qual foi incubada, com tampa fechada, em temperatura ambiente, por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 4 minutos para a obtenção do DNA. As amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C para posterior utilização nas reações de PCR.

#### *4.6.2. Quantificação de DNA*

O DNA extraído foi quantificado através da leitura de absorbância em espectrofotômetro Nanovue (GE) utilizando comprimento onda igual a 260nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280nm, para a detecção de uma eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando as relações entre as densidades ópticas,  $A_{260}/A_{280}$ , encontrava-se entre 1,6 e 1,9 o material foi considerado puro.

#### 4.6.3. Detecção do DNA do HPV por PCR Nested

A identificação do DNA do HPV nas amostras de tumores do colo do útero, foi obtida utilizando-se a técnica de amplificação PCR-Nested utilizando o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Califórnia, USA). Esta técnica consiste na amplificação do DNA de interesse em dois rounds e utilizando *primers* específicos para cada um a World Health Organization (WHO, 2009). Com a realização de dois rounds de PCR a primeira amplificação é realizada de forma mais abrangente e a segunda reação, que utiliza como produto o amplicon produzido no primeiro round, leva à amplificação de sequências menores e mais específicas do DNA viral.

No primeiro round utilizou-se os *primers* PGMY 09 e 11 (Quadro 1), amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral; no segundo round foram utilizados os primers GP+5 e GP+6, que amplificam sequências de 190pb da região L1 do DNA viral (VIDAL *et al.*, 2016). Como controle positivo da reação, utilizamos amostras conhecidamente positivas e, como controle negativo, foi utilizada água.

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

**Quadro 1:** Sequências de *primers* utilizados para a reação de PCR Nested para a identificação do DNA do HPV. (Adaptado de COUtlÉE *et al.*, 2002).

<b>Primer</b>	<b>Sequencia 5' - 3'</b>	
<b>PGMY11</b>	PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
	PGMY11-B	GCG CAG GGC CAT 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
<b>PGMY09</b>	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-Ia	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-Pa	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
	HMB01b	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT
<b>GP+5/6</b>	GP+5	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC
	GP+6	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C

Para a reação de amplificação utilizando os *primers* PGMY09/11, a desnaturação inicial ocorreu por 2 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95°C, 40 segundos de anelamento a 55°C, 40 segundos de extensão a 72°C. A reação consistiu em um volume final de 25 µl contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5µl de tampão de reação 10X, 0,5µl de cloreto de magnésio a 50 Mm, 10 Mm de dNTP e 0,2 µl de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) (COUtlÉE *et al.*, 2002).

O segundo round da reação de PCR Nested foi realizado com os *primers* GP5+/GP6+ com uma desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C seguida por 45 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C por 1 min, anelamento a 40°C por 1 minuto e extensão por 1 minuto a 72°C. Ao final da reação obteve-se 25 µl de volume, contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,5µl de tampão 10X, 1,5µl de cloreto de magnésio a 50 Mm, 10 Mm de dNTP e 0,3 µl de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) (COUtlÉE *et al.*, 2002).

#### *4.6.4. Visualização dos produtos amplificados*

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. Uma alíquota de 5 $\mu$ L de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0,1% de Gel Red sendo toda a mistura aplicada no gel.

#### *4.6.5. Purificação de produtos de PCR*

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

#### *4.6.6. Sequenciamento Automatizado*

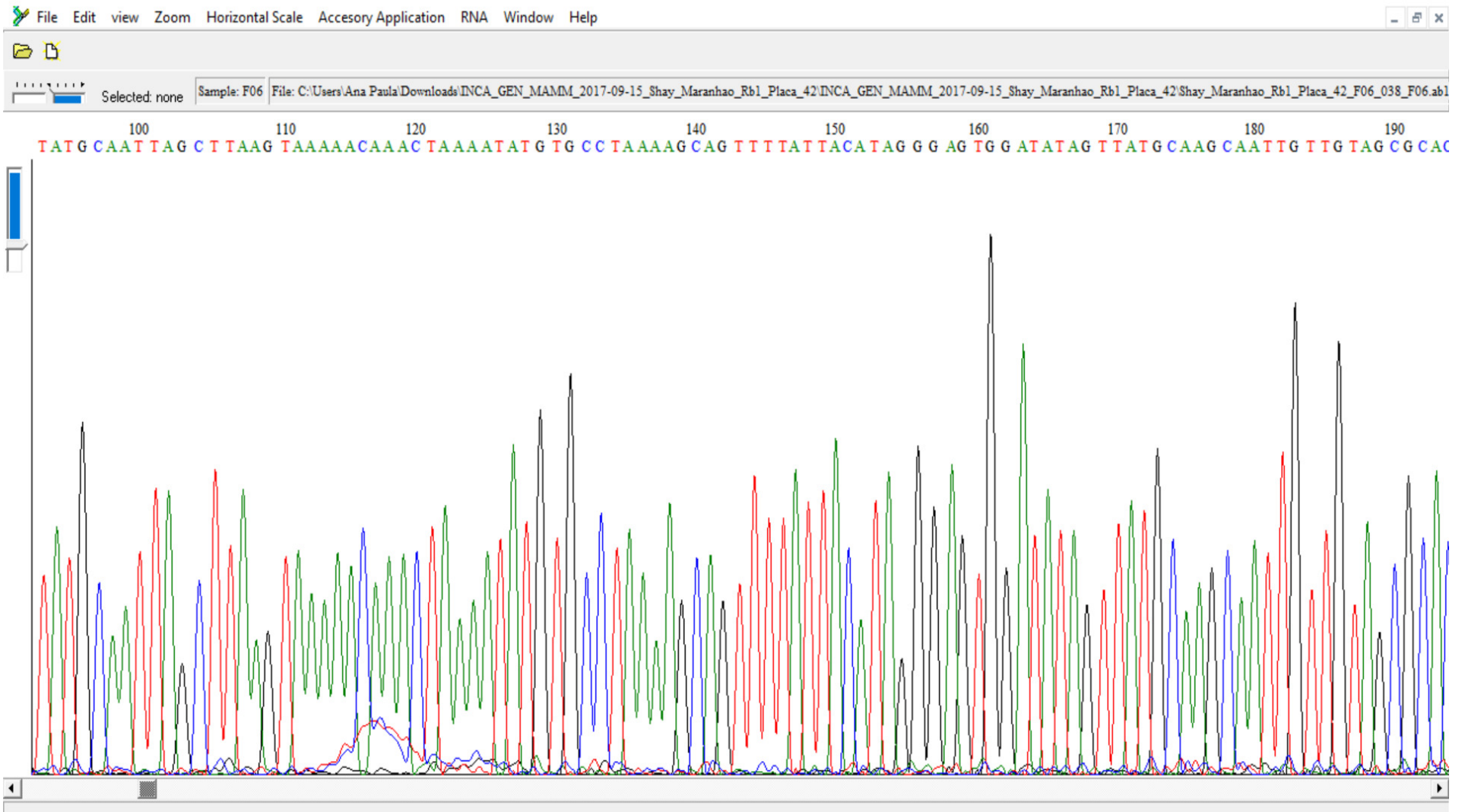
A determinação dos genótipos do HPV foi realizada por sequenciamento automatizado do produto de PCR utilizando o sequenciador MegaBACE 1000 (GE Healthcare, UK). As reações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Maranhão localizado no Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC - UEMA).

O sequenciamento foi realizado com o kit ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare, UK), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados, em cada reação, 2  $\mu$ L do produto de PCR purificado, 40 ng dos oligonucleotídeos específicos para o éxon utilizado (senso ou antisenso) e 2  $\mu$ L do kit Big Dye.

Para a análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foi utilizado o programa Chromas, obtendo-se eletroferogramas de

sequencias de DNA do HPV presentes nas amostras. Para a confirmação e identificação do tipo do HPV, foi realizada a comparação das sequências nucleotídicas das amostras sequenciadas, submetendo-as ao Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – Gene Bank, utilizando o programa BLAST (NCBI). (Figura 11).





**Figura 11:** Eletroferograma do sequenciamento de amostra positiva para o HPV 16, demonstrando-se que não houve infecção. **Fonte:** Autor próprio.

#### 4.6.7. Identificação das variantes de HPV 16

Após a caracterização das linhagens de HPV 16, amostras positivas foram submetidas a PCR utilizando primers específicos para amplificação das regiões LCR e o gene E6 do vírus. A reação consistiu de um volume final de 25 $\mu$ L, sendo 1X PCR Buffer, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 $\mu$ M de cada DNTP, 100pmol/L de cada primer, 50 – 100ng de DNA, e 2.5 U de Platinum Taq Polymerase. A reação ocorreu a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 1 min a 95°C; 1 min a temperatura de anelamento e 1 min a 72°C, seguido por uma etapa de extensão final por 15 min.

O produto da PCR foi posteriormente purificado e sequenciado de acordo com protocolo citado anteriormente. Sequências consenso foram unidas usando o software Geneious (Biomatters Ltd.) e todas as sequências geradas foram alinhadas de acordo com as linhagens específicas para o HPV 16, utilizando sequências referência propostas por Burk *et al* (2013) utilizando o software MEGA (versão 6.0, [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). Em seguida, as sequências são submetidas ao software online BLAST (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para a identificação dos tipos de HPVs.

#### 4.7. Análise estatística

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

#### **4.8. Análise por Filogenia**

A construção filogenética das linhagens de HPV 16 foi realizada utilizando dados de sequências de 1300pb referentes as regiões de E6 e LCR através do método “neighbour joining” com distancia p (obtidas com *pairwise deletion*) utilizando o programa Mega 4.1. Foram incluídas as referências propostas por Burk *et al* (2013). A análise das variantes de HPV 16 foi realizada no Instituto Nacional do Câncer (INCA) sob a supervisão do geneticista Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira.

#### **4.9. Aspectos Éticos**

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

Ressalta-se que foi garantido o sigilo, a confiabilidade e a dignidade dos sujeitos da pesquisa, bem como garantida sua autonomia e a defesa de sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 466/12.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dados sociodemográficos e clínicos

O estudo foi composto por 120 pacientes diagnosticadas com câncer do colo do útero atendidas em hospitais de referência em Oncologia do estado do Maranhão.

Dentre as mulheres com diagnóstico do câncer do colo do útero, o HPV esteve presente em 88 (88/120; 73,3%) mulheres, sendo 12 (13,8%) destas com a presença de HPV 18 (Tabela 2). A faixa etária destas compreendiam de  $\leq 29$  a  $\geq 70$ , sendo a mais jovem com 28 anos e a mais idosa com 76 anos. A maioria destas mulheres estavam na faixa etária 40 e 49 anos de idade (34/28.33%), se autodeclaravam de cor parda (84/70%), possuíam escolaridade até o ensino fundamental (51/42.50%), apresentavam renda familiar entre 1 e 2 salários mínimos (66/55%) e eram casadas ou em união consensual (62/51.67%). Com relação a associação entre variáveis sociodemográficas e a presença do HPV não houve resultado estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) para as variáveis analisadas.

**Tabela 2: Distribuição dos dados sociodemográficos da população em estudo com câncer do colo do útero e a relação com o Papilomavírus Humano (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.**

Variáveis Sociodemográficas	HPV						p-valor
	Total		Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	%	n	%	
<b>Idade (Anos)</b>							
≤ 29	8	(6.67)	4	50.00	4	50.00	0.421
30 a 39	20	(16.67)	5	25.00	15	75.00	
40 a 49	34	(28.33)	9	26.47	25	73.53	
50 a 59	19	(15.83)	7	36.84	12	63.16	
60 a 69	19	(15.83)	4	21.05	15	78.95	
≥ 70	20	(16.67)	3	15.00	17	85.00	
<b>Cor/Raça</b>							
Branca	20	(16.67)	3	15.00	17	85.00	0.377
Preta	13	(10.83)	2	15.38	11	84.62	
Amarela	3	(2.5)	1	33.33	2	66.67	
Parda	84	(70)	26	30.95	58	69.05	
<b>Estado Civil</b>							
Solteira	39	(32.5)	12	30.77	27	69.23	0.774
Casada/União Consensual	62	(51.67)	14	22.58	48	77.42	
Divorciada/Separada	6	(5)	2	33.33	4	66.67	
Viúva	13	(10.83)	4	30.77	9	69.23	
<b>Renda Familiar</b>							
Menos de 1 salário mínimo	29	(24.17)	7	24.14	22	75.86	0.797
1 a 2 salários	66	(55)	18	27.27	48	72.73	
Acima de 2 salários	20	(16.67)	4	20.00	16	80.00	
Não Sabe/Não Respondeu	5	(4.16)	3	60.00	2	40.00	
<b>Escolaridade</b>							
Nenhum	41	(34.17)	13	31.74	28	68.29	0.399
Alfabetização de Adultos	4	(3.33)	0	0.00	4	100.0	
Ensino Fundamental/1º Grau	51	(42.50)	11	21.57	40	78.43	
Ensino Médio/ 2º Grau	20	(16.67)	8	40.00	12	60.00	
Superior Incompleto	1	(0.83)	0	0.00	1	100.0	
Superior Completo	1	(0.83)	0	0.00	1	100.0	
Não Sabe/Não Respondeu	2	(1.67)	0	0.00	2	100.0	

Para os fatores de risco associados ao câncer do colo do útero, para a maioria das mulheres a primeira relação sexual ocorreu entre 10 e 19 anos de idade (87/72.50%), a primeira gestação foi mais prevalente entre 16 e 21 anos de idade (41/34.17%) e a maioria das mulheres obtiveram 1 e 3 filhos (37/30.83%). A maioria das mulheres declararam ter tido apenas um parceiro sexual durante a vida (38/31.67%), seguido por mais de 3 parceiros (36/30%). A maioria das mulheres relatou nunca ter utilizado métodos contraceptivos (70/58.33%). Similarmente, não

houve resultado estatisticamente significativo entre a associação do HPV e variáveis associadas a fatores de risco para o câncer do colo do útero ( $p < 0.05$ ). (Tabela 3).

**Tabela 3: Características dos fatores de risco e história reprodutiva de pacientes com câncer do colo do útero e a relação com a presença do Papilomavírus Humano (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.**

Fatores de Risco	HPV						p-valor
	Total		Negativo		Positivo		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Idade do início da atividade sexual (Anos)</b>							
10 a 19	87	(72.50)	25	28.74	62	71.26	0.738
20 a 29	9	(7.50)	3	33.33	6	66.67	
Acima de 30	2	(1.67)	0	0.00	2	100.0	
Não Sabe/ Não Respondeu	22	(18.33)	4	18.18	18	81.82	
<b>Idade da 1ª Gestação</b>							
11 a 15	11	(9.17)	1	9.09	10	90.01	0.268
16 a 21	41	(34.17)	14	34.15	27	65.85	
22 a 27	13	(10.83)	5	38.46	8	61.54	
Acima de 27	2	(1.67)	0	0.00	2	100.0	
Não Sabe/ Não Respondeu	53	(44.17)	12	22.41	41	77.36	
<b>Número de Gestações</b>							
1 a 3	37	(30.83)	11	29.73	26	70.27	0.859
4 a 6	26	(21.67)	6	23.08	20	76.92	
7 a 9	32	(26.67)	8	25.00	24	75.00	
10 a 12	13	(10.83)	4	30.77	9	69.23	
Acima de 12	8	(6.67)	1	12.50	7	87.50	
Não Sabe / Não Respondeu	4	(3.33)	2	50.0	2	50	
<b>Uso de Contraceptivo</b>							
Sim. Uso	7	(5.83)	2	28.57	5	71.43	0.887
Sim. Já Usei	40	(33.33)	12	30.00	28	70.00	
Não	70	(58.33)	18	25.71	52	74.29	
Não Sabe/Não Respondeu	3	(2.50)	0	0.00	3	100	
<b>Número de Parceiros Sexuais</b>							
1	38	(31.67)	11	28.95	27	71.05	0.406
2	27	(22.50)	4	14.81	23	85.19	
≥ 3	36	(30.00)	8	22.22	28	77.78	
Não Sabe/ Não Respondeu	19	(15.83)	9	47.37	10	52.63	

Quanto a realização do exame preventivo, a maioria das mulheres (84/70%) relataram ter realizado o exame antes do diagnóstico de câncer do colo

do útero e a maioria das mulheres (44/36.67%) disseram realizar o exame preventivo anualmente. Em relação ao tabagismo, a maioria das mulheres relataram não ao uso do tabaco 69(57.50%). (Tabela 4).

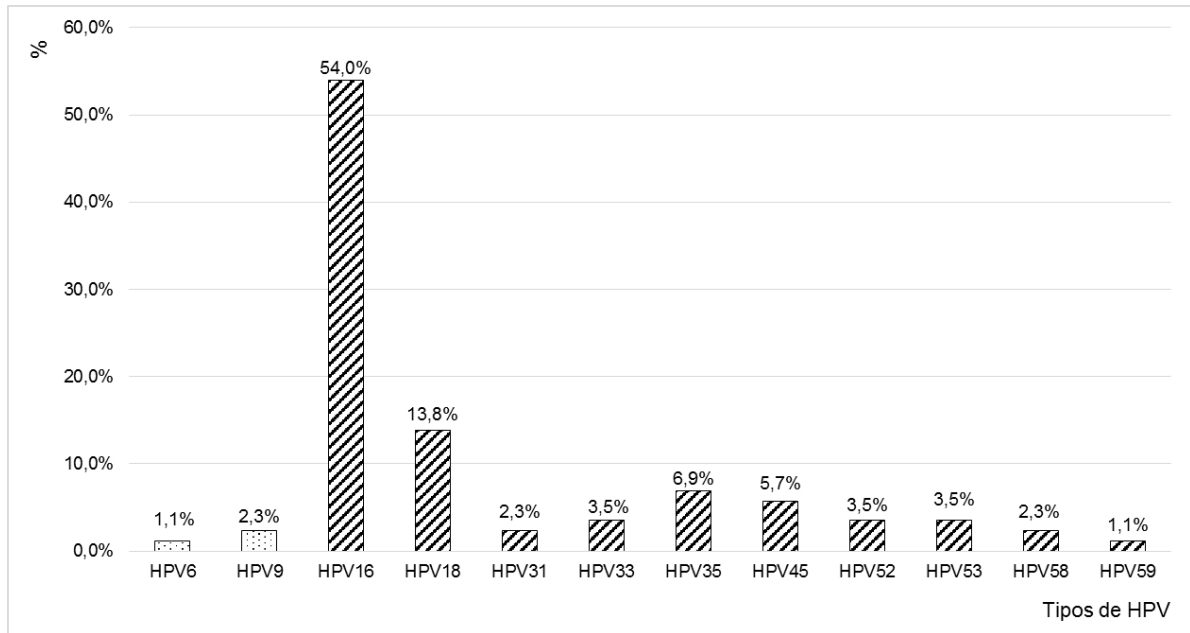
**Tabela 4: Distribuição dos pacientes conforme prática do exame preventivo e tabagismo. São Luís – Maranhão. 2016-2017.**

Fatores de Risco	HPV						p-valor
	Total		Negativo		Positivo		
	n	%	n	%	n	%	
<b>Realização do Exame Preventivo antes do diagnóstico</b>							
Não	29	(24.17)	12	41.38	17	58.62	0.070
Sim	84	(70.00)	20	23.81	64	76.19	
Não Sabe/ Não Respondeu	7	(5.83)	0	0.00	7	100.00	
<b>Frequência de realização do preventivo</b>							
Todo Ano	44	(36.67)	12	27.27	32	72.73	0.153
De 2 em 2 Anos	9	(7.50)	1	11.11	8	88.89	
De 3 em 3 Anos	1	(0.83)	1	100.0	0	0.00	
4 anos ou mais	1	(0.83)	1	100.0	0	0.00	
Sem Regularidade	32	(26.67)	8	25.00	24	75.00	
Não Sabe/ Não Respondeu	33	(27.50)	9	27.27	24	72.73	
<b>Tabagismo</b>							
Não	69	(57.50)	22	31.88	47	68.12	0.208
Sim	43	(35.83)	9	20.93	34	79.07	
Não Sabe/ Não Respondeu	8	(6.67)	1	12.50	7	87.50	

## 5.2. Identificação dos tipos de HPV

O HPV esteve presente em 88 mulheres (73.33%). Dentre estes, foram identificados: HPV 16 (48/54.0%); HPV 18 (12/13,8%); HPV 35 (6/6,9%); HPV 45 (5/5,7%); HPV 33, HPV 52 e HPV 53 (3/3.5%, respectivamente); HPV 9, HPV 31 e HPV 58 (2/2.3%, respectivamente) e; HPV 6 e HPV 59 (1/1.1%, respectivamente).

O HPV 16 foi o tipo mais prevalente entre os casos analisados e, juntamente com o HPV 18, chegou a 68,17% dos casos. A maioria das amostras possuíam HPV considerados de alto risco, enquanto menos de 3,4% corresponderam a tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico (Figura 12).

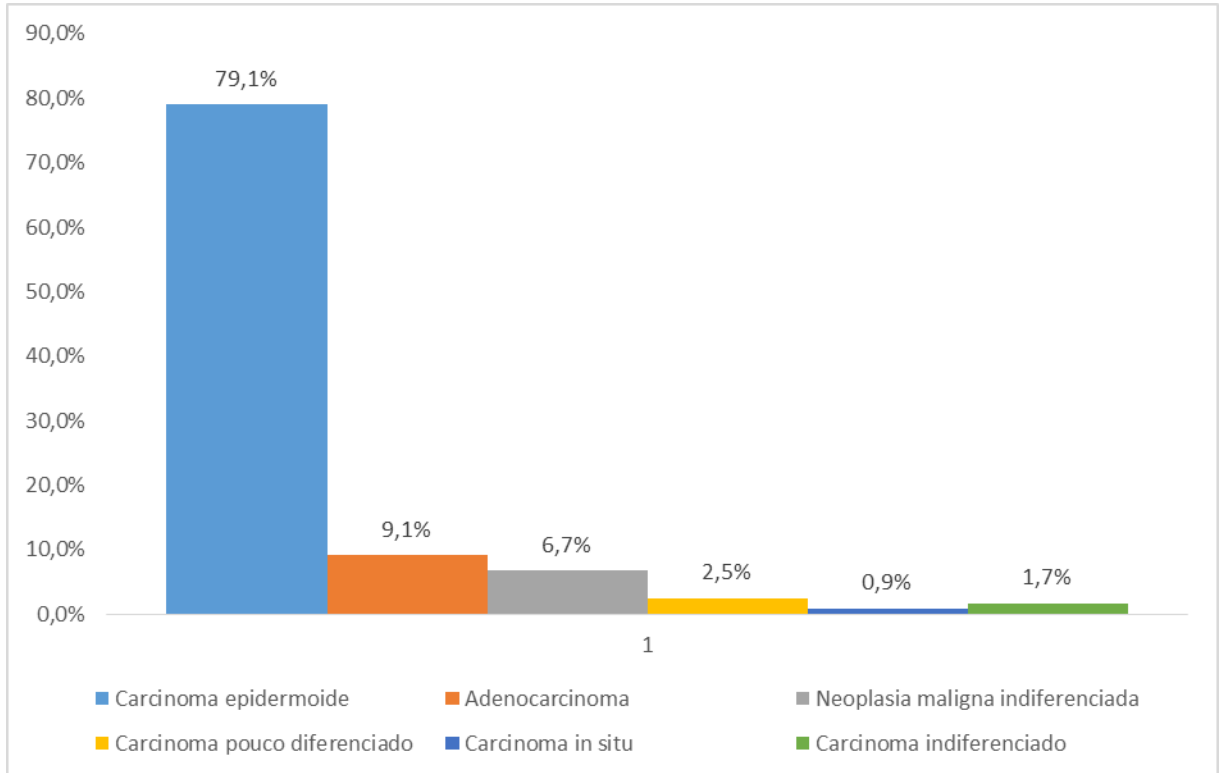


**Figura 12:** Prevalência de tipos de HPV na população estudada. São Luís - Maranhão. 2016-2017.

### 5.3. Tipos histológicos dos tumores analisados

Os tumores foram classificados de acordo com os principais tipos histológicos relacionados a carcinogênese do colo do útero. Os tipos mais prevalentes foram: o carcinoma epidermoide (CE) com um total de 95 amostras (79.1%) e os adenocarcinomas com 11 amostras (9.1%). (Figura 13).





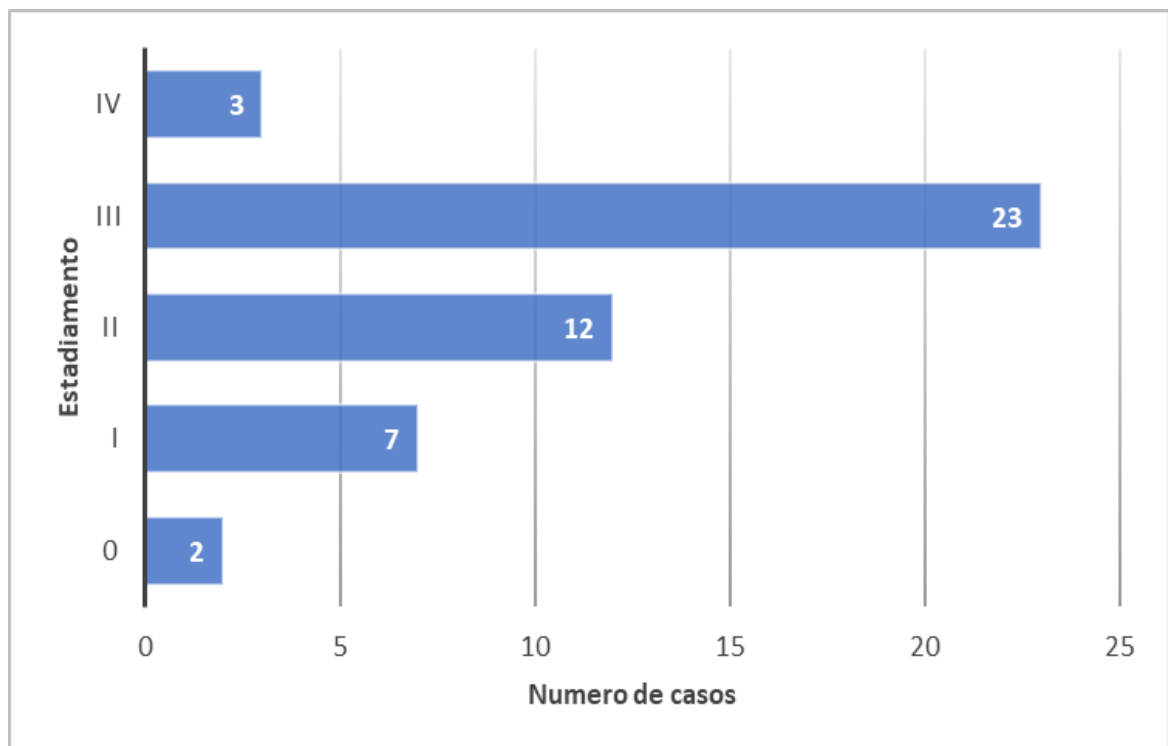
**Figura 13:** Tipos histológicos de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Das 120 mulheres em estudo, verificou-se o estadiamento do tumor, portanto 45 mulheres (37,5%) apresentaram tumores em estadio IIIB, 31 mulheres (25,8%) apresentaram estadio IIB e 11 mulheres (9,2%) apresentavam estadio I (Tabela 5). O estadio IVB esteve presente em 1 amostra (0,9%).

**Tabela 5: Estadiamento tumoral de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.**

<b>Estadiamento</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
0	3	2,5
I	11	9,2
IA	5	4,2
IB	6	5
IIA	8	6,7
IIB	31	25,8
IIIA	3	2,5
IIIB	45	37,5
IV	2	1,6
IVA	5	4,1
IVB	1	0,9
<b>TOTAL</b>	<b>120</b>	<b>100</b>

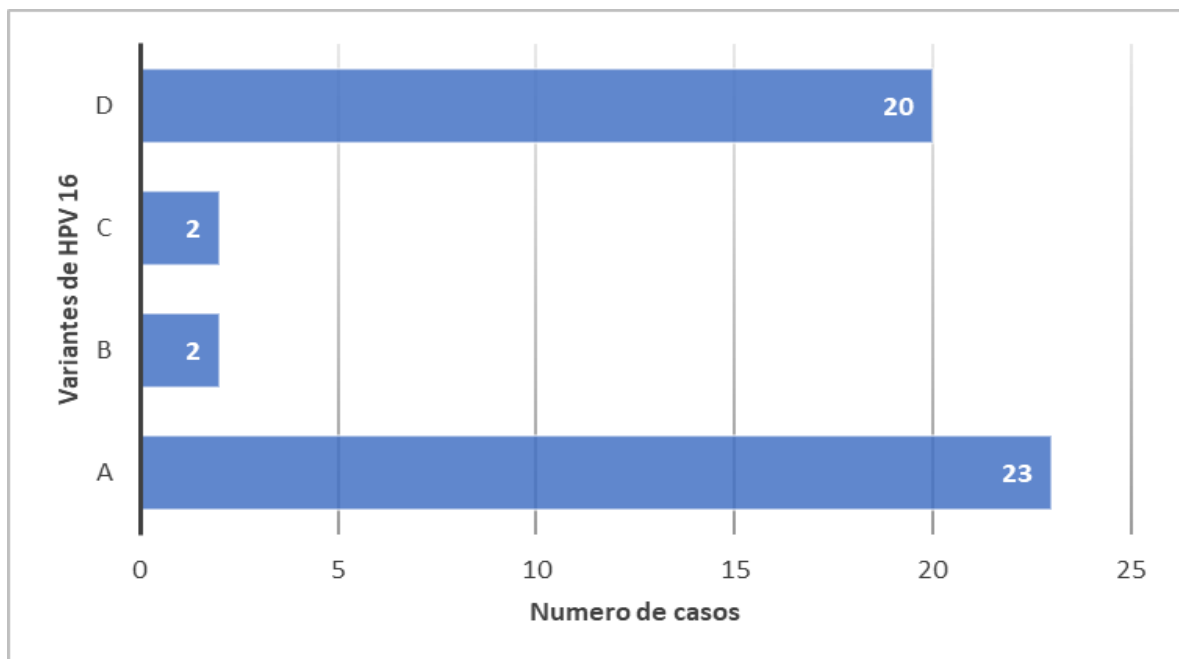
Em relação aos tumores onde houve a presença do HPV 16, predominou-se o estágio clínico III em 23 amostras, seguido pelo estágio clínico II em 12 amostras. O estágio 0 foi observado em 2 casos (Figura 14).



**Figura 14:** Distribuição dos tumores positivos para HPV 16 de acordo com o estadiamento (n = 47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.

#### 5.4. As variantes do HPV 16

Dentre as 47 amostras identificadas como HPV 16, em 23 amostras foi identificada a variante A (49%); em 20 amostras foi identificada a variante D (43%); as variantes B e C apresentaram duas amostras cada (4%).



**Figura 15:** Distribuição das variantes de HPV 16 na população estudada (n = 47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.

Em relação a idade para as mulheres com HPV 16, a média foi de 50,6 anos para mulheres com variante A; 58,5 anos para mulheres com variante B; 58,5 anos para pacientes com a variante C e 50 anos para aquelas com a variante D (Tabela 6). O tipo histológico de maior prevalência em tumores com HPV 16 foi o carcinoma de célula escamosa (CCE) em 38 amostras, seguido pelo adenocarcinoma em 4 amostras (11%).

**Tabela 6: Relação entre idade, tipos histológicos e variantes de HPV 16 identificadas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.**

Características	Variantes de HPV 16				P -valor
	A (n=23)	B (n=2)	C (n=2)	D (n=20)	
<b>Idade</b>					
Média	50,6	58,5	58,5	50	0.624
Mediana	49	58,5	58,5	46	
<b>Tipo Histológico</b>					
CCE	21 (55,5)	1 (2,7)	0 (0,0)	16 (41,6)	< 0,001
ADC	1 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (75,0)	
NMI	1 (33,3)	0 (0,0)	1 (33,3)	1 (33,3)	
CPD	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	

Legenda: CCE= carcinoma de célula escamosa, ADC= adenocarcinoma, NMI= neoplasia maligna indiferenciada, CPD = carcinoma pouco diferenciado.

Com relação entre os tipos histológicos encontrados e sua associação com as variantes de HPV, observou-se que houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis (Tabela 6). Os resultados indicam que existe uma associação entre as variantes de HPV 16 encontradas e o tipo histológico diagnosticado.

Já em relação ao estadiamento e as variantes do HPV 16, observou-se que dentre as pacientes com variante A, predominou-se o estadio III (9 pacientes), seguido pelo estadio II (8 casos) (Tabela 7). Para a variante D, predominou-se o estadiamento clínico III (10 casos), seguido pelo estadio II (4 casos).

**Tabela 7: Análise entre estadio clínico e as variantes de HPV 16 encontradas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.**

Características	Variantes de HPV 16			
	A (n = 23)	B (n = 2)	C (n = 2)	D (n = 20)
<b>Estadio Clínico</b>				
I	4	0	0	3
II	8	0	1	4
III	9	2	1	10
IV	0	0	0	3
NI	2	0	0	0

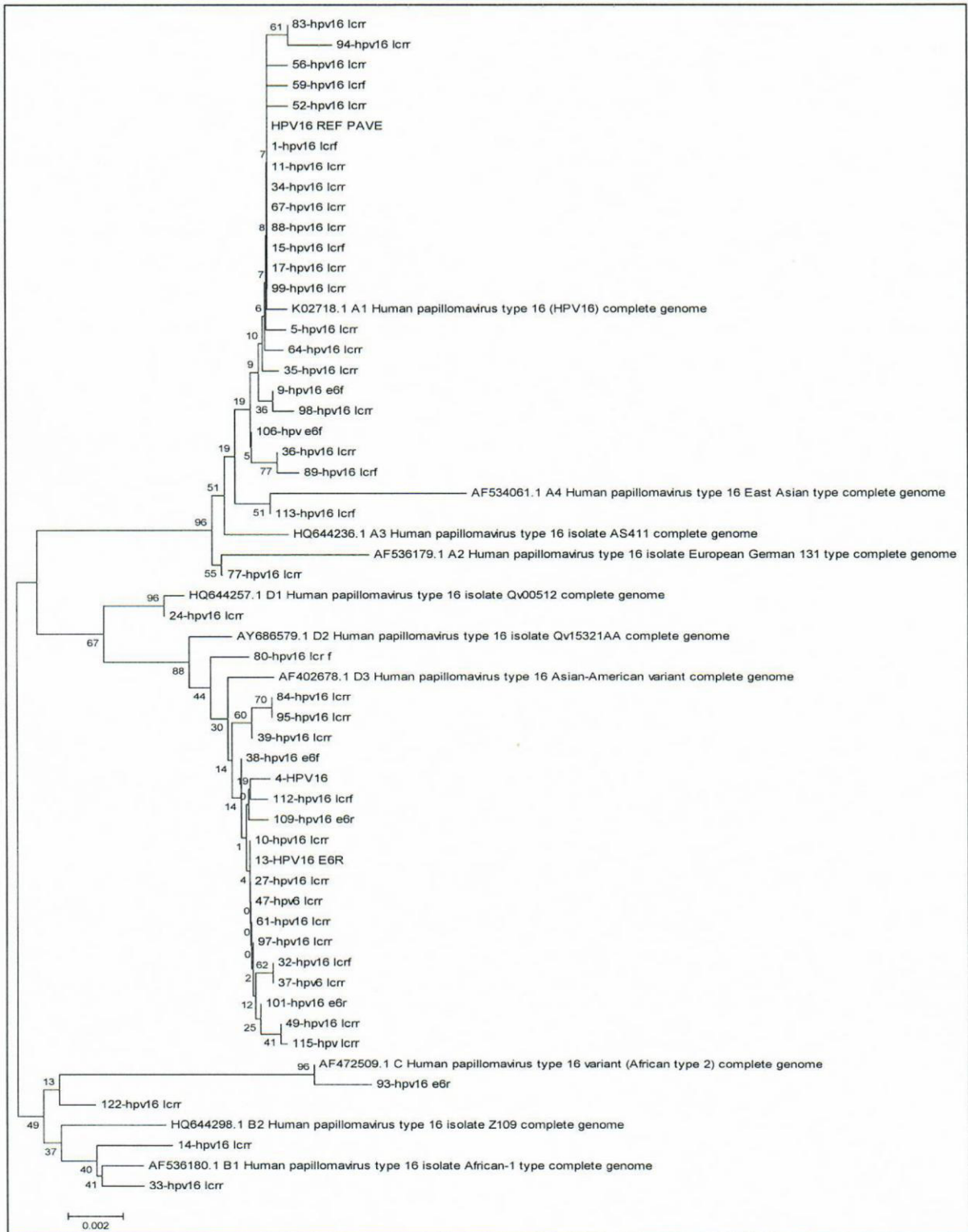
Legenda: NI = não identificado.

Com relação a resposta ao tratamento e as variantes do HPV 16 observa-se que a variante A apresentou 12 casos de resposta clínica completa, enquanto a variante D apresentou 7 casos (Tabela 8). No tocante a progressão de doença e óbito, na variante A ocorreram 2 casos, enquanto na variante D houveram 3 casos. Em 12 casos não foi possível realizar a avaliação do status da doença ao término do primeiro tratamento.

**Tabela 8: Avaliação entre resposta ao tratamento e as variantes de HPV 16 encontradas (n=47). São Luís - Maranhão. 2016-2017.**

Características	Variantes de HPV 16			
	A (n =23)	B (n = 2)	C (n = 2)	D (n =20)
<b>Resposta ao Tratamento</b>				
Resposta completa	12	0	1	7
Resposta parcial	4	0	1	5
Progressão/Óbito	2	0	0	3
NI	5	2	0	5

Legenda: NI = não identificado.



**Figura 16:** Árvore filogenética do HPV 16 com identificação de linhagens. O método utilizado foi Neighbour-Joining (para construção das filogenias) com distância “p” (obtidas com pairwise deletion), os números nos nós são valores de bootstrap (com 1000 réplicas).

Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se sequência de referência descritas por Burk *et al.*, (2013).

Dentre as amostras cervicais com HPV 16 classificadas como pertencentes a linhagem A, 21 pertenciam a sublinhagem A1, 1 pertencia a sublinhagem A2 e 1 pertencia a sublinhagem A4. Em relação as amostras pertencentes a linhagem B, 1 pertencia a sublinhagem B1 e 1 pertencia a sublinhagem B2.

Dentre as amostras cervicais do HPV 16 pertencentes a linhagem D, 1 pertencia a sublinhagem D1, 1 caso pertencia a sublinhagem D2 e 18 casos pertenciam a sublinhagem D3. A linhagem C, com 2 casos, não possui sublinhagens (Figura 16).

**Tabela 9: Distribuição de sublinhagens de HPV 16 de acordo com o tipo histológico (n=47). São Luís – Maranhão. 2016-2017.**

<b>Sublinhagem</b>	<b>Carcinoma epidermoide</b>	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>Neoplasia maligna indiferenciada</b>	<b>Carcinoma indiferenciado</b>
<b>Idade</b>	49.3±15.7	60.7±17.6	47.3±16.4	66.5±13.4
<b>A1</b>	19	0	2	0
<b>A2</b>	1	0	0	0
<b>A4</b>	0	1	0	0
<b>B1</b>	0	0	0	1
<b>B2</b>	1	0	0	0
<b>C</b>	0	0	1	1
<b>D1</b>	1	0	0	0
<b>D2</b>	1	0	0	0
<b>D3</b>	14	3	1	0
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

## 6. DISCUSSÃO

O câncer do colo do útero está associado a baixos índices socioeconômicos, apresentando maior prevalência em regiões de elevada pobreza, elevados índices de analfabetismo e hábitos de higiene precários (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2009; PINHO-FRANÇA; CHEIN; THULER, 2016).

Evidenciou-se que houve elevada prevalência do vírus (88/120 – 73%) em amostras tumorais do colo do útero. A prevalência do HPV em amostras de câncer cervical invasivo podem variar de 70% a 100% e podem estar associados a diferentes técnicas utilizadas para a detecção do vírus (COUTLÉE *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

O HPV 16 é o mais prevalente no câncer cervical em todo o mundo, seguido pelo HPV 18. Mas, a frequência entre os tipos de HPV podem variar de acordo com a região geográfica da população em análise. Outros estudos apontam que os tipos 16, 18, 31 e 45 como os quatro tipos de HPV mais prevalentes nas Américas do Sul e Central (WENTZENSEN *et al.*, 2016; SERRANO *et al.*, 2017).

Neste estudo, a maior frequência foi de HPV 16 (47/54%), HPV 18 (12/13.8%), HPV 35 (6/6.9%) e do HPV 45 (5/5.7%). Dados obtidos em outros estados (Rio de Janeiro e Belém) do Brasil são equivalentes quanto a variabilidade na prevalência dos diferentes tipos de HPV (COLPANI *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2016; NOGUEIRA DIAS GENTA *et al.*, 2017).

Avaliou-se a relação entre a presença do HPV e características sociodemográficas e fatores de risco associados ao câncer do colo do útero, mas não houveram diferenças estatisticamente significativas para as variáveis analisadas ( $P > 0,05$ ). Alguns estudos sugerem que o câncer cervical está associado a fatores socioeconômicos como o nível de escolaridade e renda.

Estudos têm buscado avaliar o papel das variantes intratipo de HPV16 e HPV18 na persistência da infecção pelo vírus, no risco do desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical e na instalação do câncer cervical invasivo (BURK; HARARI; CHEN, 2013; CHEN *et al.*, 2015). Tanto para o HPV 16 como para o HPV 18 a distribuição das linhagens em todo o mundo sofre influência geográfica e étnica.

Neste estudo, 47 amostras foram submetidas a análise para detecção de variantes. Dentre estas, 23 (49%) foram identificadas como pertencentes a variante



A, 2 (4%) identificadas como pertencentes a variante B, 2 casos (4%) com a variante C e 20 casos (43%) com a variante D. Poucos estudos foram realizados descrevendo a frequência de linhagens em câncer cervical invasivo associado à infecção pelo HPV 16.

Em um estudo de caso-controle realizado por Hang *et al.*, (2016), buscou-se avaliar a associação entre as variantes de HPV 16 e o risco de câncer cervical em 298 casos de mulheres com HPV 16 na China. Dentre os casos de câncer cervical predominou-se a variante A.

No estudo realizado por Volpini *et al.*, (2017) no Brasil em 24 mulheres positivas para HPV 16 e com diagnóstico de HIV, porém com Papanicolau normal, a linhagem A com 70,8% dos casos (17/24) foi a mais frequente, seguido pelas linhagens C e D que somadas totalizaram 29,2% das amostras (7/24). A variante B não foi encontrada neste estudo.

Em um estudo realizado na Holanda por King *et al.*, (2016) em 241 indivíduos homens e mulheres, nos quais identificou-se o HPV 16, 93% (223/241) eram pertencentes a variante A e os demais 7% (18/241) eram pertencentes as variantes B, C e D somadas. Vale *et al.*, (2016) ressaltar que as variantes não europeias foram coletadas de indivíduos que se autodeclararam naturais do Suriname ou Antilhas.

Em um estudo realizado no Brasil por Vidal *et al.*, (2016) com uma coorte de 594 mulheres com câncer cervical invasivo, 334 mulheres apresentaram HPV 16. Dentre estas, 217 (65%) eram pertencentes a linhagem A, 97 (29%) eram pertencentes a variante D. As variantes B e C apresentaram cada uma, 10 casos (3%).

Villa *et al.*, (2000), também no Brasil, determinaram as diferenças geográficas entre as variações intratipo de HPV 16 e sua associação com o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical. A prevalência mais elevada detectada (54%) foi a linhagem A, seguido da linhagem D em 22% dos casos. Ressalta ainda a forte associação entre persistência e a presença das sublinhagens não europeias B, C e D quando comparado com o protótipo europeu A.

No presente estudo em São Luís do Maranhão relata-se que a linhagem mais prevalente na população estudada foi a linhagem A para o HPV 16, seguida pela linhagem D.

Estudos também indicam uma variação na distribuição dos tipos de HPV entre os tipos histológicos. O HPV 16 tem estado mais associado ao carcinoma de célula

escamosa; já o HPV 18 apresenta maior prevalência em adenocarcinoma do que o HPV 16, entretanto, poucos estudos foram realizados no intuito de identificar associação entre variantes de HPV 16 e o tipo histológico de tumores cervicais (ALTEKRUSE *et al.*, 2003; BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009).

Neste estudo, do total, 95 amostras (79.1%) foram classificadas como carcinoma de célula escamosa (CCE) e 11 amostras (9.1%) como adenocarcinomas (ADC). Também foram encontradas 2 amostras classificadas como neoplasia maligna indiferenciada e 1 amostra classificada como carcinoma indiferenciado. Dentre as amostras positivas para o HPV 16, 38 (81%) foram de CCE e 04 (9%) de ADC. Observou-se, também, uma forte associação entre as variantes de HPV 16 encontradas e o tipo histológico dos tumores cervicais ( $p < 0,001$ ).

No estudo de Hang *et al.*, 2016, observou-se dentre os casos de mulheres com câncer do colo do útero infectadas com o HPV 16, 289 (97%) apresentaram padrão de carcinoma de células escamosas, seguido por adenocarcinoma (2.3%) e carcinoma adenoescamoso (0.7%).

No estadiamento tumoral, das 120 mulheres, 45 pacientes (37.5%) pertenciam ao estágio IIIB, seguido por 31 pacientes no estágio IIB (25.8%). Já entre as pacientes positivas para o HPV 16, do total, 23 encontravam-se no estágio III, seguido por 12 no estágio II e 7 no estágio I.

Neste estudo sobre HPV 16 a média e mediana de idade foram de 50,9 e 47 anos respectivamente, corroborando com dados da literatura que indicam maior incidência em mulheres com mais de 45 anos e atingindo pico médio aos 50,9 anos (MUÑOZ *et al.*, 2006; CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2009; DE SANJOSÉ; BROTONS; PAVON, 2017).

No estudo de Nogueira Dias Genta *et al.*, (2017) em 292 mulheres diagnosticadas com câncer cervical invasivo, a prevalência dos tipos de HPV variou de acordo com o tipo histológico e o estadiamento clínico. O adenocarcinoma estava associado a maiores casos de HPV 18 do que ao HPV 16. Já em relação ao estadiamento, não houve diferenças entre os tipos de HPV encontrados associados ao estágio de doença e a sobrevivência.

Poucos estudos foram realizados com o intuito de avaliar a resposta ao tratamento oncológico e as variantes do HPV 16. Zuna *et al.*, (2011) após analisar 155 casos de cânceres do colo do útero HPV16 positivos (132 casos de variantes E x 23 casos de variantes NE) chegaram a conclusão de que as variantes não

européias mostraram um comportamento menos agressivo no tocante a mortalidade do que as variantes européias. Ressalta, entretanto, que os dados devem ser avaliados com cautela devido ao pequeno número de casos de variantes NE do estudo.

Em nossa casuística encontramos maior número de variantes NE (B, C e D) no total. Dos 47 casos temos 23 com a variante A (E) e 24 com as variantes B, C e D. A mortalidade no grupo das variantes NE foi de 13 % (3/24), enquanto na variante A (E) foi de 9% (2/23). O número de casos nos quais ocorreu resposta completa foi menor nas variantes NE (33% x 52%). Tais achados podem ser explicados pelo grande número de casos da variante D em nossa casuística (20 casos). Estudo de Burk *et al.*, (2013), demonstrou a agressividade específica desta variante).

Já em relação as sublinhagens do HPV 16, neste estudo observou-se a predominância da sublinhagem A1 (21 casos), seguido pela sublinhagem D3 (18 casos). No estudo de Hang *et al.*, (2016), a sublinhagem A4 estava significativamente associada a um maior risco de cancer cervical comparado com as sublinhagem A1 - A3 (OR=1.72, 95%IC).

Em um estudo de Alfaro *et al.*, (2016) em 462 mulheres com cancer cervical, identificou-se o HPV 16 em 50.9% dos casos. Dentre estas, predominou-se a sublinhagem A1\2 (31.4%), seguido pela sublinhagem D2 (10.4%) e D3 (9.1%). Entretanto, as variantes AA representaram 38.7% dos casos de HPV 16 positivas.

Já o estudo de Nicolas-Parraga *et al.*, (2017), buscaram explorar a associação entre a prevalência de linhagens do HPV 16 em pacientes com cancer do colo do utero provenientes da Europa, America do Sul – Central, Asia e Africa. Identificou-se 118 casos de carcinoma de celula escamosa, 120 de adenocarcinoma e 53 de carcinoma adenoescamoso. Observou-se, tambem, maior prevalencia do HPV 16 em pacientes com carcinoma de celulas escamosas. Com relação as variantes de HPV 16 encontradas, predominou-se a sublinhagem A1 – 3 em carcinomas de celulas escamosas (de 76.9 a 97% para diferentes regioes geograficas) e grande variação para a variante D em relação a região geografica em adenocarcinoma (de 28.6 a 63.3% para diferentes regioes geograficas) e carcinoma adenoescamoso (de 12.5 a 61.5% para difereentes regioes geograficas).

Os dados tambem demonstraram aumento na prevalencia de A1 – 3 na Europa (de 67.9 a 97% para todos os tipos histologicos), variante D na America do Sul-Central (61.5 a 63%, para adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso), A4 na

Asia (de 11.5 a 27.6% para todos os tipos histológicos) e variantes B e C para África (de 28 a 66.7% e de 12.3 para 37.5% para CCE e ADC) (NICOLAS-PARRAGA *et al.*, 2017).

Tais resultados mostram associação diferencial entre linhagens de HPV 16 e a apresentação histológica dos tumores cervicais em diferentes regiões geográficas. Diferenças moleculares entre linhagens virais e interações com os tumores podem ser um dos fatores associados à variação de prevalência observada.

Em relação aos aspectos socioeconômicos, 70% das mulheres autodeclararam-se pardas, 51.6%, casadas ou em união consensual, 55% apresentavam renda de 1 a 2 salários mínimos e 42.5% apresentavam escolaridade até o 1º grau. Estes dados são coerentes com outros estudos já descritos (BERRAHO *et al.*, 2017; HALLE *et al.*, 2017; JAIN *et al.*, 2017). As taxas de incidência do câncer cervical tendem a ser elevadas em regiões de maior disparidade socioeconômica, entre elas a residência em regiões rurais de elevada pobreza, ausência de saneamento básico e acesso precário aos serviços de saúde (PRUMMEL *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

O estudo realizado por Wang *et al.*, (2015) reportou que a prevalência de mulheres que realizaram o teste Papanicolaou mostrou elevação dos níveis de educação, corroborando com outros estudos, podendo este estar associado à falta de informação e demora na busca por tratamento. Em um estudo realizado por Manga *et al.*, (2015) em 209 mulheres que buscavam atendimento para o rastreamento do câncer cervical, a média de idade foi de 39.6 anos, sendo que apenas 15% das mulheres não eram letradas, 88% eram casadas e 48% possuíam atividade remunerada.

No estudo de Jain *et al.*, (2017) em 765 pacientes com câncer cervical, a média de idade foi de 54 anos. Dentre as pacientes, 53.6% eram analfabetas e houve forte associação entre idade e nível educacional com o estadiamento da doença. Indicadores socioeconômicos podem fornecer informações sobre conscientização da importância da procura aos serviços de saúde, através de mediadores psicológicos, econômicos e sociais (WANG *et al.*, 2015; MUSSELWHITE *et al.*, 2016).

Em um estudo de caso-controle realizado por Berraho *et al.*, (2017) observou-se que o nível educacional, a multiparidade e a multiplicidade de parceiros sexuais estavam significativamente associados ao câncer cervical. Além destes, a realização de intercurso durante o período menstrual e histórico de múltiplas infecções

sexualmente transmissíveis também mostraram associação com o desenvolvimento do câncer cervical.

Em um estudo em larga-escala realizado por Makuza *et al.*, (2015), visando o rastreamento de câncer cervical e suas lesões precursoras, detectou-se uma prevalência de 1.7% de câncer cervical e 5.9% de lesões pré-câncer na população. A maioria das mulheres reportaram ter tido 4 ou mais gestações, utilizaram contraceptivos orais por mais de cinco anos e declararam ter tido apenas um parceiro sexual durante a vida. Também se identificou que o risco de desenvolvimento do câncer cervical aumentou em mulheres não casadas (solteiras, viúvas e divorciadas) (MAKUZA *et al.*, 2015). A multiparidade tem sido consistentemente associada ao câncer cervical em diversos estudos de caso-controle, reportando um aumento no risco de desenvolvimento de HSIL/CC com o aumento no número de gestações (CASTELLSAGUE; MUÑOZ, 2003).

O uso do tabaco foi reportado em nosso estudo em 38.3% das mulheres. Estudos têm indicado uma tendência quanto a associação entre o tabaco e o câncer (CASTELLSAGUE; MUÑOZ, 2003; WOHLMEISTER *et al.*, 2016).

Neste estudo realizado em São Luís – MA, evidenciou-se que a linhagem A foi a mais prevalente entre as pacientes com HPV 16, corroborando com dados da literatura que evidenciam a maior prevalência da variante A em populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira.

Novos estudos são necessários para que se possa entender a origem e progressão do câncer, bem como a relação entre o HPV 16 e suas variantes com o desenvolvimento das lesões precursoras do câncer do colo do útero. Os dados aqui apresentados poderão auxiliar o desenvolvimento de futuros estudos epidemiológicos acerca de variantes do HPV 16, assim como na criação de estratégias para o combate dos tipos que permanecem circulantes, e que não foram incluídos nas vacinas contra o vírus HPV atualmente disponíveis.

## 7. CONCLUSÃO

– Dentre as mulheres com câncer do colo do útero, a maioria estavam na faixa etária de 40 a 49 anos de idade, se autodeclararam de cor parda, possuíam escolaridade até o ensino fundamental, apresentaram renda familiar entre 1 e 2 salários mínimos e eram casadas ou em união estável;

– A maioria das mulheres analisadas iniciaram atividade sexual entre 10 e 19 anos de idade, tiveram a primeira gestação entre 11 e 15 anos de idade, tiveram entre 1 e 3 filhos, reportaram não utilizar contraceptivos e possuíram apenas um parceiro sexual durante a vida;

– As mulheres portadoras do HPV 16 apresentaram média de idade de 50 a 58,5 anos;

– Os tipos histológicos mais prevalentes entre as mulheres com HPV 16 foi o carcinoma de célula escamosa e o adenocarcinoma;

– Em relação as variantes do HPV 16 encontradas, predominou-se a linhagem A, seguido pela linhagem D;

– Dentre as sublinhagens do HPV 16 predominou-se as sublinhagens A1, seguido pela sublinhagem D3;

– O presente estudo poderá contribuir para a compreensão dos tipos de HPV, bem como as variantes de HPV16 circulantes na população maranhense, contribuindo para o desenvolvimento de programas de controle e prevenção do câncer do colo do útero.

## REFERÊNCIAS

- ALFARO, A.; JUÁREZ-TORRES, E.; MEDINA-MARTÍNEZ, I.; MATEOS-GUERRERO, N.; BAUTISTA-HUERTA, M.; ROMÁN-BASSAURE, E. *et al.* Different Association of Human Papillomavirus 16 Variants with Early and Late Presentation of Cervical Cancer. **PLoS One**. Dec 30;11(12):e0169315. doi: 10.1371/journal.pone.0169315. 2016.
- ALTEKRUSE, S. F.; LACEY, J.V. JR.; BRINTON, L.A.; GRAVITT, P.E.; SILVERBERG, S.G.; BARNES, W.A. JR. *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, p. 657–663, 2003.
- ANACKER, D. C.; MOODY, C. A. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Res**. Mar 2;231:41-49. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.006. 2017.
- ARANDA, S.; BERKLEY, S.; COWAL, S.; DYBUL, M.; EVANS, T.; IVERSEN, K. *et al.* Ending cervical cancer : A call to action. **Gynecology & Obstetrics**, v. 138, p. 4–6, 2017.
- ARENDS, M. J.; BUCKLEY, C. H.; WELLS, M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. **Journal of clinical pathology**, v. 51, n. 2, p. 96–103, 1998.
- ARIAS-PULIDO, H.; PEYTON, C.L.; TORREZ-MARTÍNEZ, N.; ANDERSON, D.N.; WHEELER, C.M. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 22–34, 2005.
- AWUA, A. K.; ADANU, R.M.K.; WIREDU, E.K.; AFARI, E.A.; ZUBUCH, V.A.; ASMAH, R.H. *et al.* Unique LCR variations among lineages of HPV16, 18 and 45 isolates from women with normal cervical cytology in Ghana. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 85, 2017.
- BAHLS, L.; YAMAKAWA, R.; ZANÃO, K.; ALFIERI, D.; FLAUZINO, T.; DELONGUI, F. *et al.* Human Leukocyte Antigen Class I and Class II Polymorphisms and Serum Cytokine Profiles in Cervical Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1478, p. 1–15, 2017.
- BANSAL, A.; SINGH, M. P.; RAI, B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem Biology of Human Papilloma. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 84–89, 2016.

BARROETA, J. E.; ADHIKARI-GURAGAIN, D.; GROTKOWSKI, C. E. Cervical cancer screening in the era of HPV vaccination: A review of shifting paradigms in cytopathology. **Diagnostic Cytopathology**, 2016, p. 1–12, 2017.

BARTOLI, J. M.; MOULIN, G.; DELANNOY, L.; CHAGNAUD, C.; KASBARIAN, M. The normal uterus on magnetic resonance imaging and variations associated with the hormonal state. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 13, n. 3, p. 213–220, 1991.

BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. 1–6, 2005.

BERNARD, H.U.; CALLEJA-MACIAS, I.E.; DUNN, S.T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **Int J Cancer**. Mar 1;118(5):1071-6. 2006.

BERRAHO, M.; AMARTI-RIFFI, A.; EL-MZIBRI, M.; BEZAD, R.; BENJAAFAR, N.; BENIDEER, A. *et al.* HPV and cofactors for invasive cervical cancer in Morocco: a multicentre case- control study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 435, p. 1–9, doi: 10.1186/s12885-017-3425-z. 2017.

BERUMEN, J.; ORDOÑEZ, R.M.; LAZCANO, E.; SALMERON, J.; GALVAN, S.C.; ESTRADA, R.A. *et al.* Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **J Natl Cancer Inst**. 93(17):1325-30. 2001.

BIRYUKOV, J.; MEYERS, C. Papillomavirus infectious pathways: A comparison of systems. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4303–4325, 2015.

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; SERRANO, B.; MENA, M.; GÓMEZ, D. *et al.* Human Papillomavirus and Related Diseases Report. **ICO Information Centre on HPV and Cancer** (HPV Information Centre), 2017.

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.

BURK, R.D.; TERAJ, M.; GRAVITT, P.E.; BRINTON, L.A.; KURMAN, R.J.; BARNES, W.A. *et al.* 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.; 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. 0, p. 232–243, 2013.



BURK, R.D.; CHEN, Z.; HARARI, A.; SMITH, B.C.; KOCJAN, B.J.; MAVER, P.J. *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 Dermatovenerol Alp Panonica Adriat**, v. 20, n. 3, p. 113–123, 2013.

CAMARA, G.N.N.L.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149–158, 2008.

CAMPOS, N.G.; CAMPOS, N.G.; SHARMA, M.; CLARK, A.; LEE, K.; GENG, F.; REGAN, C. *et al.* The health and economic impact of scaling cervical cancer prevention in 50 low- and lower-middle-income countries. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 138, p. 47–56, 2017.

CAO, M.; SHAH, W.; QI, J.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; CHEN, H. Prognostic significance of human papillomavirus viral load in correlation with different therapeutic modalities in cervical cancer patients. **Pathology Research and Practice**, v. 212, n. 9, p. 804–810, 2016.

CASTELLSAGUE, X.; MUÑOZ, N. Chapter 3 : Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis — Role of Parity , Oral Contraceptives , and Tobacco Smoking OF USE IN. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 31, p. 20–28, 2003.

CASTELLSAGUÉ, X.; SCHNEIDER, A.; KAUFMANN, A.M.; BOSCH, F.X. HPV vaccination against cervical cancer in women above 25 years of age: Key considerations and current perspectives. **Gynecologic Oncology**, v. 115, n. 3 SUPPL., p. S15–S23, 2009.

CASTLE, P.E.; RODRIGUEZ, A.C.; PORRAS, C.; HERRERO, R.; SCHIFFMAN, M.; GONZALEZ, P. *et al.* A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 34, n. 11, p. 849–855, 2007.

CHAKRABARTI, O.; VEERARAGHAVALU, K.; TERGAONKAR, V.; *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.

CHAUX, A.; NETTO, G.J.; RODRÍGUEZ, I.M.; BARRETO, J.E.; OERTELL, J.; OCAMPOS, S. *et al.* Epidemiologic Profile, Sexual History, Pathologic Features, and Human Papillomavirus Status of 103 Patients with Penile Carcinoma. **World J Urol**. Aug;31(4):861-7. doi: 10.1007/s00345-011-0802-0. 2013.

CHEAH, P. L.; LOOI, L. M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. **The Malaysian journal of pathology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 1998.

CHEN, A.A.; GHEIT, T.; FRANCESCHI, S.; TOMMASINO, M.; CLIFFORD, G.M.; IARC HPV VARIANT STUDY GROUP. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. **Journal of Virology**, v. 89, n. 20, p. 10680–10687, 2015.

CHEN, W.; MOLIJN, A.; ENQI, W.; ZHANG, X.; JENKINS, D.; YU, X. *et al.* The variable clinicopathological categories and role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma : A hospital based nation-wide multi-center retrospective study across China. **International Journal of Cancer**, v. 139, p. 2687–2697, 2016.

CHEN, Z.; DE FREITAS, L.B.; BURK, R.D. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods Mol Biol.** 1249:3-26. doi: 10.1007/978-1-4939-2013-6\_1. 2015.

CLIFFORD, G.M.; SMITH, J.S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide : a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, 88, 63 – 73, 2003.

COLPANI, V.; BIDINOTTO, A.B.; FALAVIGNA, M.; GIOZZA, S.P.; BENZAKEN, A.S.; PIMENTA, C. *et al.* Prevalence of papillomavirus in Brazil: a systematic review protocol. **BMJ Open**, v. 6, p. 10–13, 2016.

COUPLÉE, F.; GRAVITT, P.; KORNEGAY, J.; HANKINS, C.; RICHARDSON, H.; LAPOINTE, N. *et al.* Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 902–907, 2002.

CROSSLEY, B.; CROSSLEY, J. A review of the use of human papilloma virus (HPV) in cervical screening. **British Journal of Biomedical Science**, v. 4845, n. May, p. 1–5, 2017.

D'ABRAMO, C.M.; ARCHAMBAULT, J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. **Open Virol J.**;5:80-95. doi: 10.2174/1874357901105010080. 2011.

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 Oncol.* 2009 Apr;5(3):359-70. doi: 10.2217/fon.09.8.

DE BOER, M.; PETERS, L.A.; AZIZ, M.F.; SIREGAR, B.; CORNAIN, S.; VREDE, 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 SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVON, M.A. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2017.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DIZ, M.D.P.E.; MEDEIROS, R.B. Câncer de colo uterino – fatores de risco , prevenção, diagnóstico e tratamento. *Revista de Medicina*, v. 88, n. 1, p. 7–15, 2009.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, v. 110, n. 5, p. 525–541, 2006.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, v. 25, p. 2–23, 2016.

EKLUND, C.; FORSLUND, O.; WALLIN, K.L.; ZHOU, T.; DILLNER J. The 2010 Global Proficiency Study of Human Papillomavirus Genotyping in Vaccinology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 7, p. 2289–2298, 2012.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R.A.; WOOD, N.H.; LEMMER, J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer*, v. 4, n. 16, p. 1–9, 2009. doi: 10.1186/1750-9378-4-16. 2009

FERRAZ, L.D.C.; SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

GALLOWAY, D. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, v. 116, n. 8, p. 1477–1490, 2016.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*, v. 34, n. 1, p. 113–123, 2009.

GASPERIN, S. I.; BOING, A. F.; KUPEK, E. Cervical cancer screening coverage and associated factors in a city in southern Brazil : a population- based study. *Caderno de Saúde Pública*, v. 27, n. 7, p. 1312–1322, 2011.

GHEIT, T.; CORNET, I.; CLIFFORD, G. M.; IFTNER, T.; MUNK, C.; TOMMASINO, M. *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, 2011.

GRABOWSKI, M.K.; KONG, X.; GRAY, R.H.; SERWADDA, D.; KIGOZI, G.; GRAVITT, P.E. *et al.* Partner Human Papillomavirus Viral Load and Incident Human Papillomavirus Detection in Heterosexual Couples. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, p. 948–956, 2016.

GRAVITT, P. E. The known unknowns of hpv natural History. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4599, 2011.

GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Detection of Papillomavirus Gene Expression Patterns in Tissue Sections. **Current Protocols in Microbiology**, n. May, p. 14B.7.1-14B.7.20, 2016.

GRODZKI, M.; BESSON, G.; CLAVEL, C.; ARSLAN, A.; FRANCESCHI, S.; BIREMBAUT, P. *et al.* Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** Apr;15(4):820-2. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0864. 2006.

HALLE, M.K.; OJESINA, A.I.; ENGERUD, H.; WOIE, K.; TANGEN, I.L.; HOLST, F. *et al.* Clinicopathologic and molecular markers in cervical carcinoma: a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, n. June, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HANG, D.; YIN, Y.; HAN, J.; JIANG, J.; MA, H.; XIE, S. *et al.* Analysis of human papillomavirus 16 variants and risk for cervical cancer in Chinese population. **Virology.** Jan 15;488:156-61. doi: 10.1016/j.virol.2015.11.016. 2016.

HARARI, A.; CHEN, Z.; BURK, R.D. HPV Genomics: Past, Present and Future. **Curr Probl Dermatol.** 45:1-18. doi: 10.1159/000355952. 2014.

HARARI, A.; CHEN, Z.; RODRÍGUEZ, A.C.; HILDESHEIM, A.; PORRAS, C.; HERRERO, R. Cross-protection of the Bivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Against Variants of Genetically Related High-Risk HPV Infections. **J Infect Dis.** Mar 15;213(6):939-47. doi: 10.1093/infdis/jiv519. 2016.

HARDEN, M.E.; PRASAD, N.; GRIFFITHS, A.; MUNGER, K. Modulation of microRNA-mRNA Target Pairs by Human Papillomavirus 16 Oncoproteins. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.

HERFS, M.; YAMAMOTO, Y.; LAURY, A.; WANG, X.; NUCCI, M.R.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M.E. *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, 2012.

HILDESHEIM, A. *et al.* A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus (HPV) variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Research**. 70(8):3159-69, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4179. 2010.

HO, L.; CHAN, S.Y.; BURK, R.D.; DAS, B.C.; FUJINAGA, K.; ICENOGLE, J.P. *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. 67, n. 11, p. 6413–6423, 1993.

HOFFMAN, S. R.; LE, T.; LOCKHART, A.; SANUSI, A.; DAL SANTO, L.; DAVIS, M. *et al.* Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a systematic review. **International Journal of Cancer**, p. 1–37, 2016

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Research**, 2016.

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

JAIN, A.; GANESH, B.; BOBDEY, S.C.; SATHWARA, J.A.; SAOBA, S. Sociodemographic and Clinical Profile of Cervical Cancer Patients Visiting in a Tertiary Care Hospital in India. **Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n. 3, p. 291–295, 2017.

KING, A. J., SONSMA, J.A., VRIEND, H.J., VAN DER SANDE, M.A., FELTKAMP, M.C., BOOT, H.J., KOOPMANS, M.P. Genetic diversity in the major capsid L1 protein of HPV-16 and HPV-18 in the Netherlands. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–11, 2016.

KUKIMOTO, I.; MURAMATSU, M. Genetic variations of human papillomavirus type 16: implications for cervical carcinogenesis. **Jpn J Infect Dis**. 68(3):169-75. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.584. 2015.

LETO, M.G.P.; GILDO SANTOS JÚNIOR, F.; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306–317, 2011.

LI, W. J. XU, H.X., CHEN, Z.H., XU, W.D., WU, Y.J. Characteristics of Carcinogenic Human Papillomavirus Infection in Suzhou : Epidemiology, Vaccine Evaluation, and Associated Diseases. **J Med Virol**. May;89(5):895-901. doi: 10.1002/jmv.24700. 2017.

- LICHTIG, H.; ALGRISI, M.; BOTZER, L. E.; ABADI, T.; VERBITZKY, Y.; JACKMAN, A. *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, 2006.
- MA, Y.; MADUPU, R.; KARAOZ, U.; NOSSA, C.W.; YANG, L.; YOOSEPH, S. *et al.* Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. **Journal of Virology**, v. 88, n. 9, p. 4786–4797, 2014.
- MAKUZA, J.D.; NSANZIMANA, S.; MUHIMPUNDU, M.A.; PACE, L.E.; NTAGANIRA, J.; RIEDEL, D.J. Prevalence and risk factors for cervical cancer and pre-cancerous lesions in Rwanda. **Pan African Medical Journal**, v. 8688, p. 1–8, doi: 10.11604/pamj.2015.22.26.7116. 2015.
- MANGA, M.M.; FOWOTADE, A.; ABDULLAHI, Y.M.; EL-NAFATY, A.U.; ADAMU, D.B.; PINDIGA, H.U. *et al.* Epidemiological patterns of cervical human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in North-Eastern Nigeria. **Infect Agent Cancer**. Oct 2;10:39. doi: 10.1186/s13027-015-0035-8. 2015.
- MARTINS, T.R.; MENDES DE OLIVEIRA, C.; ROSA, L.R.; DE CAMPOS CENTRONE, C.; RODRIGUES, C.L.; VILLA, L.L.; LEVI, J.E. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions : correlation to cytological data. **Virology Journal**, v. 13, n. 138, p. 1–9, 2016.
- MARUŠIČ, M.; HOŠNJAK, L.; KRAFČIKOVA, P.; POLJAK, M.; VIGLASKY, V.; PLAVEC, J. The effect of single nucleotide polymorphisms in G-rich regions of high-risk human papillomaviruses on structural diversity of DNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, May;1861(5 Pt B):1229-1236. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.11.007. 2017.
- MEZEI, A.K., ARMSTRONG, H.L., PEDERSEN, H.N., CAMPOS, N.G., MITCHELL, S.M., SEKIKUBO, M. *et al.* Cost-effectiveness of cervical cancer screening methods in low and middle-income countries: a systematic review. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 3, p. 437–446, 2017.
- MO, X.; GAI TOBE, R.; WANG, L.; LIU, X.; WU, B.; LUO, H. *et al.* Cost-effectiveness analysis of different types of human papillomavirus vaccination combined with a cervical cancer screening program in mainland China. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 502, 2017.
- MOSCICKI, A.B.; SCHIFFMAN, M.; BURCHELL, A.; ALBERO, G.; GIULIANO, A.R.; GOODMAN, M.T. *et al.* Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. **Vaccine**. 20;30 Suppl 5:F24-33. doi: 10.1016/j.vaccine. 2012.05.089. 2012.
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V. *et al.* Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **N Engl J Med**. Feb 6;348(6):518-27. 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. S3, p. 1–10, 2006.

MUSSELWHITE, L.W.; OLIVEIRA, C.M.; KWARAMBA, T.; DE PAULA PANTANO, N.; SMITH, J.S.; FREGNANI, J.H. *et al.* Racial/Ethnic Disparities in Cervical Cancer Screening and Outcomes. **Acta Cytologica**, v. 60, p. 518–526,. DOI: 10.1159/000452240. 2016.

NASCIMENTO, M.D.D.S.B.; VIDAL, F.C.B.; SILVA, M.A.C.N.; BATISTA, J.E.; BARBOSA, M.C.L.; MUNIZ FILHO, W.E.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C.; BRANCO, R.C.C.; BRITO, L.M.O. Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. **BMC Womens Health**. Jan 2;18(1):1. doi: 10.1186/s12905-017-0499-3. 2018.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C.; SOLOMON, D. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. **Comprehensive Cytopathology**, v. 60611, p. 77–90, 2008.

NICOLÁS-PÁRRAGA, S.; ALEMANY, L.; DE SANJOSÉ, S.; BOSCH, F.X.; BRAVO, I.G. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. **Int J Cancer**. May 1;140(9):2092-2100. doi: 10.1002/ijc.30636. 2017.

NOGUEIRA DIAS GENTA, M.L.; MARTINS, T.R.; MENDOZA LOPEZ, R.V.; SADALLA, J.C.; DE CARVALHO, J.P.M.; BARACAT, E.C. *et al.* Multiple HPV genotype infection impact on invasive cervical cancer presentation and survival. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182854, 22 ago. 2017.

OGILVIE, G., NAKISIGE, C., HUH, W.K., MEHROTRA, R., FRANCO, E.L., JERONIMO, J. Optimizing secondary prevention of cervical cancer : Recent advances and future challenges. **Gynecology & Obstetrics**, v. 138, p. 15–19, 2017.

ORTIZ-ORTIZ, J.; ALARCÓN-ROMERO, L. C.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, M.A.; GARZÓN-BARRIENTOS, V.H.; CALLEJA-MACÍAS, I.; BARRERA-SALDAÑA, H.A. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. **Virol J**. Feb 22;12:29. doi: 10.1186/s12985-015-0242-3. 2015.

PEREZ-PLASENCIA, C.; DUENAS-GONZALEZ, A.; ALATORRE-TAVERA, B. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. **Int Arch Med**. Jul 7;1(1):10. Doi: 10.1186/1755-7682-1-10. 2008.

PIERCE CAMPBELL, C.M.; KREIMER, A.R.; LIN, H.Y.; FULP, W.; O'KEEFE, M.T.; INGLES, D.J. *et al.* Long-term persistence of oral human papillomavirus type 16: The HPV Infection in Men (HIM) Study. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 3, p. 190–196, 2016.

PINHO-FRANÇA, J.D.R.; CHEIN, M.B.D.C.; THULER, L.C.S. Patterns of cervical cytological abnormalities according to the Human Development Index in the northeast region of Brazil. **BMC women's health**, v. 16, p. 54, 2016.

PINIDIS, P.; TSIKOURAS, P.; IATRAKIS, G.; ZERVOUDIS, S.; KOUKOULI, Z.; BOTHOU, A. *et al.* Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. **Maedica - a Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 1, p. 48–54, 2016.

PISTA, A.; OLIVEIRA, A.; BARATEIRO, A.; COSTA, H.; VERDASCA, N.; PAIXÃO, M.T. Molecular Variants of Human Papillomavirus Type 16 and 18 and Risk for Cervical Neoplasia in Portugal. **Journal of Medical Virology**, v. 1897, n. July, p. 1889–1897, 2007.

PRUMMEL, M.V.; YOUNG, S.W.; CANDIDO, E.; NISHRI, D.; ELIT, L.; MARRETT, L.D. Cervical Cancer Incidence in Ontario Women Differing Sociodemographic Gradients by Morphologic Type. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 7, p. 1341–1346, 2014.

RAMANAKUMAR, A.V.; NAUD, P.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DE CARVALHO, N.S.; DE BORBA, P.C.; TEIXEIRA, J.C. *et al.* Incidence and duration of type-specific human papillomavirus infection in high-risk HPV-naïve women: results from the control arm of a phase. **BMJ Open**, v. 6, 2016.

RAPOSO, S.; OLIVEIRA, C. F. DE. Estadiamento dos cancros ginecológicos : FIGO 2009. **Adenda**, p. 623–628, 2009.

RAZZAGHI, H.; SARAIYA, M.; THOMPSON, T.D.; HENLEYM S,J.; VIENS, L.; WILSON, R. Five-year relative survival for human papillomavirus-associated cancer sites. **Cancer**. 1;124(1):203-211. doi: 10.1002/cncr.30947. 2017.

RICHARD, C.; LANNER, C.; NARYZHNY, S. N.; SHERMAN, L.; LEE, H.; LAMBERT, P.F. *et al.* The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. **Oncogene**. 10;29(23):3435-45, doi: 10.1038/onc.2010.93. 2010.

RIVOIRE, W. A., CAPP, E., CORLETA, H.VON E., ILMA SILVA, S.B. Bases Biomoleculares da Oncogenese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 2, p. 179–84, 2001.

RODRIGUES, L.C., SPECK, N.M., FOCCHI, G.R., SCHIMIDT, M.A., MARQUES, R.M., RIBALTA, J.C. Immunoexpression of HPV 16/18 E6 and E7 oncoproteins in high-grade cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-positive women. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.

RUDOLPH, S.E.; LORINCZ, A.; WHEELER, C.M.; GRAVITT, P.; LAZCANO-PONCE, E.; TORRES-IBARRA, L. *et al.* Population-based prevalence of cervical infection with human papillomavirus genotypes 16 and 18 and other high risk types in Tlaxcala, Mexico. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 461, 2016.



SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A.C.; CHEN, Z.; WACHOLDER, S.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Res.** Apr 15;70(8):3159-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4179. 2010.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S.; FAKHRY, C.; MONK, B.J. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. **Primer**, v. 2, p. 1–20, 2016.

SERRANO, B.; BROTONS, M.; BOSCH, F.X.; BRUNI, L. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, p. 1–13, 2017.

SICHERO, L.; FERREIRA, S.; TROTTIER, H.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A.; FRANCO, E.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, 2007.

SIERRA, M.S., SOERJOMATARAM, I., ANTONI, S., LAVERSANNE, M., PIÑEROS, M., DE VRIES, E., FORMAN, D. Cancer patterns and trends in Central and South America. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. S23–S42, 2016.

SIMMS, K.T.; HALL, M.; SMITH, M.A.; LEW, J.B.; HUGHES, S.; YUILL, S. *et al.* Optimal Management Strategies for Primary HPV Testing for Cervical Screening: Cost-Effectiveness Evaluation for the National Cervical Screening Program in Australia. **PLoS One**. Jan 17;12(1):e0163509. doi: 10.1371/journal.pone.0163509. 2017.

SONGOCK, W. K.; KIM, S.; BODILY, J. M. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. **Virus Research**, 2016.

SOTO, D.; SONG, C.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. **Viruses**, v. 9, n. 248, p. 2–18, 2017.

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

STAMENKOVI, M.; KNEŽEVIĆ, A.; KNEŽEVIĆ, I.; KUZMANOVIĆ, I.; KARALIĆ, D.; MILENKOVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, T. High-risk human papilloma virus genotypes in cervical carcinoma of Serbian women: Distribution and association with pathohistological findings. **Biologicals**, v. 44, p. 412–416, 2016.

SYRJANEN, S.; PURANEN, M. Human Papillomavirus Infections in Children: The Potential Role of Maternal Transmission. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 274, n. 2, p. 259–274, 2000.

TAMEGÃO-LOPES, B.P.; SOUSA-JÚNIOR, E.C.; PASSETTI, F.; FERREIRA, C.G.; DE MELLO, W.A.; DUARTE SILVESTRE, R.V. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 25, p. 1–7, 2014.

TANG, Y., ZHENG, L., YANG, S., LI, B., SU, H., ZHANG, L.P. Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Southwest China : a cross-sectional five years study in non-vaccinated women. **Virology Journal**, v. 14, n. 84, p. 1–10, 2017.

THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**. Dec 13;18(53):7690-700. 1999.

TJALMA, W.A.A., VAN WAES, T.R., VAN DEN EEDEN, L.E., BOGERS, J.J. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 19, n. 4 SPEC. ISS., p. 469–483, 2005.

TOMMASINO, M. The biology of beta human papillomaviruses. **Virus Res**. 231:128-138. doi: 10.1016/j.virusres.2016.11.013. 2017.

VACCARELLA, S., LAVERSANNE, M., FERLAY, J., BRAY, F. Cervical cancer in Africa, Latin America and the Caribbean, and Asia: regional inequalities and changing trends. **International Journal of Cancer**, p. 1–17, 2017.

VALE, D. B., SAUVAGET, C., MUWONGE, R., FERLAY, J., ZEFERINO, L.C., MURILLO, R., SANKARANARAYANAN, R. Disparities in time trends of cervical cancer mortality rates in Brazil. **Cancer Causes & Control**, v. 27, n. 7, p. 889–896, 2016.

VEO, C.A.R.; SAAD, S.S.; FREGNANI, J.H.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; TSUNODA, A.T.; RESENDE, J.C. *et al.* Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5399–5405, 2015.

VIDAL, F.C.B.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; FERRARO, C.T.L.; BRITO, L.M.O. Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano : revisão da literatura. **Femina**, v. 40, n. 5, p. 264–267, 2012.

VIDAL, J.P.C.B., FELIX, S.P., CHAVES, C.B., PATURY, P., FRANCO, V.F., DE MORAIS, E.A., *et al.* Genetic Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients With Invasive Cervical Cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 88, p. 1279–1287, 2016.

VIDELA, S.; DARWICH, L.; CANADAS, M. Natural History of Human Papillomavirus Infections Involving Anal, Penile, and Oral Sites Among HIV-Positive Men. **Sexually transmitted Diseases**, v. 40, n. 1, p. 3–10, 2013.

VILLA, L. L., SICHERO, L., RAHAL, P., CABALLERO, O., FERENCZY, A., ROHAN, T., FRANCO, E.L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2000, p. 2959–2968, 2000.

VINEIS, P.; WILD, C. P. Global cancer patterns: causes and prevention. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 549–557, 2013.

VOLPINI, L.P.B.; BOLDRINI, N.A.T.; DE FREITAS, L.B.; MIRANDA, A.E.; SPANO LC. The high prevalence of HPV and HPV16 European variants in cervical and anal samples of HIV-seropositive women with normal Pap test results. Tornesello ML, ed. **PLoS ONE**. 12(4):e0176422. doi:10.1371/journal.pone.0176422. 2017.

VYAS, N.S.; PIERCE CAMPBELL, C.M.; MATHEW, R.; ABRAHAMSEN, M.; VAN DER KOOI, K.; JUKIC, D.M. *et al.* Role of Histological Findings and Pathologic Diagnosis for Detection of Human Papillomavirus Infection in Men. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 10, p. 1777–1787, 2016.

WALHART, T. Human Papillomavirus Biology, Pathogenesis, and Potential for Drug Discovery: A Literature Review for HIV Nurse Clinical Scientists. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 26, n. 6, p. 693–702, 2015.

WANG, B.; HE, M.; CHAO, A.; ENGELGAU, M.M.; SARAIYA, M.; WANG, L. *et al.* Cervical Cancer Screening Among Adult Women in China, 2010. **The Oncologist**, v. 20, p. 627–634, 2015.

WATSON, M.; BENARD, V.; FLAGG, E.W. Assessment of trends in cervical cancer screening rates using healthcare claims data: United States, 2003–2014. **Preventive Medicine Reports**. 9 124–130. 2018.

WENTZENSEN, N., SCHIFFMAN, M., PALMER, T., ARBYN, M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. **Journal of Clinical Virology**, v. 76, p. S49–S55, 2016.

WITTEKIND, CH.; ASSAMURA, H.; SOBIN, L.H. **TNM atlas**. 6. ed. Malaysia: UICC, John Wiley & Sons Ltda. 2014.

WOHLMEISTER, D.; VIANNA, D.R.; HELFER, V.E.; GIMENES, F.; CONSOLARO, M.E.; BARCELLOS, R.B. *et al.* Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 2, p. 106–113, doi: 10.1590/0074-02760150330. 2016.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human papillomavirus laboratory manual**. [S.l.]. 2009.

XI, L. F., WANG, Y., CHEN, N., JIANG, D., QIU, Y., WANG, Y. *et al.* Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. January, p. 4–11, 2007.

YIN, F.; WANG, Y.; CHEN, N.; JIANG, D.; QIU, Y.; WANG, Y. *et al.* A novel trivalent HPV 16/18/58 vaccine with anti-HPV 16 and 18 neutralizing antibody responses comparable to those induced by the Gardasil quadrivalent vaccine in rhesus macaque model. **Papillomavirus Research**, v. 3, n. December 2016, p. 85–90, 2017.

ZACAPALA-GÓMEZ, A.E.; DEL MORAL-HERNÁNDEZ, O.; VILLEGAS-SEPÚLVEDA, N.; HIDALGO-MIRANDA, A.; ROMERO-CÓRDOBA, S.L.; BELTRÁN-ANAYA, F.O. *et al.* Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. **Virology**, v. 488, p. 187–195, 2016.

ZIGRAS, T., LENNOX, G., WILLOWS, K., COVENS, A. Early Cervical Cancer: Current Dilemmas of Staging and Surgery. **Current oncology reports**, v. 19, n. 8, p. 51, 2017.

ZUNA, R.E.; MOORE, W.E.; SHANESMITH, R.; TERENCE DUNN, S.; WANG, S.S.; SCHIFFMAN, M. *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.; TULLER, E.; WENTZENSEN, N.; MATHEWS, C.; ALLEN, R.A.; SHANESMITH, R. *et al.* HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, p. 19, 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in Anogenital Cancer as a Model to Understand the Role of Viruses in Human Cancers. *Cancer Research*, v. 49, n. 17, p. 4677–4681, 1989.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Seminars in cancer biology*, v. 9, p. 405–411, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 9, p. 690–8, 2000.

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

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

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
BIOBANCO DE TUMORES E DNA DO MARANHÃO  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

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

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

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

**OBJETIVO DO ESTUDO**

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

**PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

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

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





## **ANEXOS**

**Anexo A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MARANHÃO/MA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

**Pesquisador:** Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 47408215.0.0000.5087

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

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

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.289.419

**Apresentação do Projeto:**

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

**Endereço:** Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho

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

**UF:** MA **Município:** SÃO LUÍS

**Telefone:** (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.289.419

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

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

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

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

Benefícios:

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

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

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

Continuação do Parecer: 1.289.419

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

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

**Recomendações:**

Não existem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não existem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512297.pdf	21/07/2015 09:22:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE do Projeto Universal Dra Desterro.doc	21/07/2015 09:21:49		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto Universal FAPEMA 2015 Dra. Desterro.pdf	21/07/2015 09:21:36		Aceito

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.289.419

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

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO LUIS, 21 de Outubro de 2015

---

Assinado por:  
**FRANCISCO NAVARRO**  
(Coordenador)

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

**Anexo B: Questionário Sociodemográfico**

Número do Questionário: |\_|\_|\_|\_|\_|

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

**QUESTIONÁRIO**

Nome da unidade de saúde: \_\_\_\_\_

Nº do prontuário/registo na unidade de saúde: |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE**

Nome da entrevistada: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ cep: |\_|\_|\_|\_|\_|\_| - |\_|\_|\_|\_|

Tel. Residencial: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Tel. Comercial: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

**TIPO DE ENTREVISTA**

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

|\_|\_| Série OU |\_|\_| Período

|\_|\_| Grau

**6. Qual a sua religião?**

1|\_|\_| Eu não tenho religião

2|\_|\_| Católica

3|\_|\_| Evangélica/Methodista/Batista/Presbiteriana/Protestante/Cristã

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

5|\_|\_| Espiritismo Kardecista

6|\_|\_| Budista

7|\_|\_| Judaica

8|\_|\_| Mulçumana

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

**7. Quantos cômodos existem na sua casa?**

|\_|\_|\_| cômodos

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

|\_|\_|\_| cômodos

**9. Quantas pessoas moram na sua casa?**

|\_|\_|\_| pessoas

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

\_\_\_\_\_|\_|\_|\_|

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

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

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

|\_|\_|\_| pessoas

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

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

99999,99 |\_|\_| NS/NR

00000,00 |\_|\_| Não tem renda



---

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


---

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

**Entrevistador: Leia as alternativas.**

- 1|\_\_| Excelente  
 2|\_\_| Muito bom  
 3|\_\_| Bom  
 4|\_\_| Regular  
 5|\_\_| Ruim

---

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


---

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

- 1|\_\_| Sim                      2|\_\_| Não (*passa e leia o Quadro 4*)

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

- |   |           |           |
|---|-----------|-----------|
| 1 Câncer do colo do útero                   | 1 __  sim | 2 __  não |
| 2 Inflamações                               | 1 __  sim | 2 __  não |
| 3 Infecções                                 | 1 __  sim | 2 __  não |
| 4 Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) | 1 __  sim | 2 __  não |
| 5 Outros _____                              | 1 __  sim | 2 __  não |
- especifique

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

- 1|\_\_| Sim                      2|\_\_| Não

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

- |\_\_|\_\_| anos    99|\_\_| NS/NR

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

- 1|\_\_| Mais de uma vez por ano  
 2|\_\_| Todo ano  
 3|\_\_| De 2 em 2 anos  
 4|\_\_| De 3 em 3 anos  
 5|\_\_| Com intervalo de mais de 3 anos  
 6|\_\_| Sem regularidade  
 9|\_\_| Não sabe/Não respondeu

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

**Entrevistador: Leia as alternativas.**

1|\_\_| Consequia logo marcar a consulta

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

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

4|\_\_| Outra situação, qual? \_\_\_\_\_

**ENTREVISTADORA: LEIA O QUADRO ABAIXO**

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

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

|\_\_|\_\_| anos

99 |\_\_| NS/NR

23. Você tem ou já teve atividade sexual?

1|\_\_| Sim

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

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

|\_\_|\_\_| anos

99 |\_\_| NS/NR

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

|\_\_|\_\_| parceiros

99 |\_\_| NS/NR

26. Atualmente, você tem atividade sexual?

1|\_\_| Sim (*passa 57*) 2|\_\_| Não

27. Há quanto tempo você não tem atividade sexual?

1|\_\_|\_\_| dias

2|\_\_|\_\_| semanas

3|\_\_|\_\_| meses

4|\_\_|\_\_| anos

99|\_\_| NS/NR

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

1 |\_\_| Sim, uso

2 |\_\_| Sim, já usei

3 |\_\_| Não. Por quê? \_\_\_\_\_ (*passa 60*)

especifique

**29. Qual (is)?**

Entrevistador: Leia as alternativas.

TEMPO DE USO
--------------

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

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

**36. Qual era a sua idade quando nasceu o seu último filho?**|\_|\_|anos **ou** |\_|\_|\_|\_|Ano da última gravidez **ou** |\_|\_|Idade do filho mais novo

99 |\_| NS/NR

9999 |\_| NS/NR

99 |\_| NS/NR

**38. Você já abortou ou perdeu bebê?**

1 |\_| Sim

2 |\_| Não (*passa para o quadro 10*)**39. Quantos abortos, provocados ou espontâneos, você teve?**

|\_|\_| abortos

99 |\_| NS/NR

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

**Agora farei algumas perguntas sobre menopausa****40. Você sabe o que é menopausa?**1 |\_| Sim (*passa 70*) 2 |\_| Não (*ler o texto abaixo*)

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

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

1 |\_| Sim

2 |\_| Não (*Agradeça e finalize a entrevista*)9 |\_| NS/NR (*Agradeça e finalize a entrevista*)**42. Com que idade você entrou na menopausa?**

|\_|\_| anos

99 |\_| NS/NR

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

1 |\_| Sim, usa atualmente

2 |\_| Sim, já usou

3 |\_| Nunca usou (*Agradeça e finalize a entrevista*)**44. Há quanto tempo você usa ou já usou medicação hormonal para a menopausa?**

1 |\_|\_| dias

2 |\_|\_| semanas

3 |\_|\_| meses

4 |\_|\_| anos

99 |\_|\_| NS/NR

**USO DE TABACO**

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

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

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

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

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

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

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

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

**48. Com que idade você começou a fumar?**

99   Não sabe/não respondeu

**[FUMANTE DIÁRIO]****49. Em média, quantos dos seguintes produtos você fuma por dia?**

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

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

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

*Agradeça e finalize a entrevista*

Observações: \_\_\_\_\_



## CARACTERIZAÇÃO

### Atividade Física

( 1 ) Sim ( 2 ) Não

### Qual?

( ) diário

( ) 3-4x/semana

( ) 1-2x/semana

( ) 5-6x/semana

### Antecedentes Familiares

#### 1) Câncer

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

Qual? \_\_\_\_\_

2) Osteoporose: (1) Sim (2) Não

3) Hipertensão: (1) Sim (2) Não

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

Qual doença? \_\_\_\_\_

5) Diabetes Mellitus: (1) Sim (2) Não

### Dados Clínicos da Paciente

6) Hipertensão: (1) Sim (2) Não

7) Tireioidopatia: (1) Sim (2) Não

Qual? \_\_\_\_\_

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

Qual doença? \_\_\_\_\_

9) Diabetes Mellitus: (1) Sim (2) Não

10) Cirurgia: (1) Sim (2) Não

Qual(is)? \_\_\_\_\_

11) Câncer: (1) Sim (2) Não

( ) Mama ( ) Útero ( ) Outro Qual? \_\_\_\_\_

( ) Ovário ( ) Cólon

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

Qual (is)? \_\_\_\_\_

### AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

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

### Estadiamento

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

Agradeça e finalize a entrevista

Observações: \_\_\_\_\_



## Anexo C: Recibo do Artigo submetido no European Journal of Cancer Prevention

<p><b>EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION</b> The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)</p>	 <b>Wolters Kluwer</b> <a href="#">Account</a>   <a href="#">Login</a>   <a href="#">Subscribe</a>   <a href="#">Help</a>
---	---

**European Journal of Cancer Prevention**  
**Geographic disparity of cervical cancer: Association with age, ethnicity/race and histopathological findings**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Geographic disparity of cervical cancer: Association with age, ethnicity/race and histopathological findings
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Section/Category:</b>	
<b>Keywords:</b>	cervical cancer; Incidence; Risk factors.
<b>Corresponding Author:</b>	Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, Ph.D Universidade Federal do Maranhao São Luís, Maranhão BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Maranhao
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Rodrigo Lopes Da Silva
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Rodrigo Lopes Da Silva Lailson Oliveira De Castro Liwerebeth Dos Anjos Pereira Leonardo V Galvão-Moreira Zulmira S Batista Gerusinete Dos Santos Fábio Vidal De Figueiredo Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, Ph.D
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	BRAZIL
<b>Abstract:</b>	<p>Introduction: Cervical cancer is a highly prevalent type of cancer. Although it is a preventable disease through vaccination and screening programs, over 250,000 annual deaths have been globally reported. Objective: We aimed at investigating sociodemographic and clinical factors that may be related to late diagnosis of cervical cancer in patients treated at a cancer reference center in Northeast Brazil. Methods: A retrospective epidemiological study was carried out and included a total of 3114 women, aged 17-95 years, diagnosed with cervical cancer and treated at the Aldenora Bello Hospital (São Luís, Brazil) from 2009 to 2012. Results: The majority of patients (56.71%) had non-white skin color, incomplete primary education (32.34%), and were diagnosed with squamous cell carcinoma (75.98%). These variables were significantly associated with clinical staging at diagnosis of cervical cancer (<math>p &lt; 0.05</math>). No association was observed for age group or marital status (<math>p &gt; 0.05</math>). Staging at diagnosis was also found to be associated with the outcome in the present study (<math>p &lt; 0.05</math>). Conclusion: Non-white skin color, lower educational level and histologic type were associated with advanced stage at diagnosis of cervical cancer, which can affect the disease outcome.</p>

**Anexo D: Artigo submetido: GEOGRAPHIC DISPARITY OF CERVICAL CANCER:  
ASSOCIATION WITH AGE, ETHNICITY/RACE AND HISTOPATHOLOGICAL FINDINGS**

Manuscript (All Manuscript Text Pages, including Title Page,  
References and Figure Legends)

**Geographic disparity of cervical cancer: Association with age, ethnicity/race and  
histopathological findings**

**Running head: Cervical cancer: age, race and histopathology**

Rodrigo L. da Silva<sup>1</sup>, Lailson O. de Castro<sup>2</sup>, Liwerbeth A. Pereira<sup>2</sup>, Leonardo V. Galvão-Moreira<sup>2</sup>,  
Zulmira S. Batista<sup>1</sup>, Gerusinete R.B. dos Santos<sup>1</sup>, Fábio Vidal de Figueiredo<sup>1</sup>, Maria do Desterro  
Soares Brandão Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

<sup>2</sup> School of Medicine, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil

Corresponding author:

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, MD, MS, PhD, Chair Professor, Department of  
Pathology, Federal University of Maranhão.

Postgraduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966,  
Vila Bacanga, São Luís, MA, 65080-805, Brazil.

E-mail: [cnsd\\_ma@uol.com.br](mailto:cnsd_ma@uol.com.br)

Phone: +55 98 32729520

**ABSTRACT**

**Introduction:** Cervical cancer is a highly prevalent type of cancer. Although it is a preventable disease through vaccination and screening programs, over 250,000 annual deaths have been globally reported. **Objective:** We aimed at investigating sociodemographic and clinical factors that may be related to late diagnosis of cervical cancer in patients treated at a cancer reference center in Northeast Brazil. **Methods:** A retrospective epidemiological study was carried out and included a total of 3114 women, aged 17-95 years, diagnosed with cervical cancer and treated at the Aldenora Bello Hospital (São Luís, Brazil) from 2009 to 2012. **Results:** The majority of patients (56.71%) had non-white skin color, incomplete primary education (32.34%), and were diagnosed with squamous cell carcinoma (75.98%). These variables were significantly associated with clinical staging at diagnosis of cervical cancer ( $p < 0.05$ ). No association was observed for age group or marital status ( $p > 0.05$ ). Staging at diagnosis was also found to be associated with the outcome in the present study ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Non-white skin color, lower educational level and histologic type were associated with advanced stage at diagnosis of cervical cancer, which can affect the disease outcome.

**Keywords:** Cervical cancer; Incidence; Risk factors.

## INTRODUCTION

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer, affecting over 528,000 women each year worldwide. Although it is preventable through vaccination and screening programs, more than 250,000 deaths per year have been reported. Importantly, incidence and mortality rates have declined in most developed countries, especially after the introduction of cervical cancer screening programs. On the other hand, the past decades have presented an unequal distribution in the incidence of this cancer as over 85% of cases occurred in developing countries. (1-3)

Among the existing risk factors, there is a strong association between smoking and cervical neoplasia, independently of HPV status, possibly due to the presence of carcinogens in the cervical mucus. Some haplotypes, such as HLA class II and notoriously HLA B \* 07 + HLA-DQB1 \* 302, are thought to affect HPV antigen presentation and immune response, thereby playing a role in the development of squamous intraepithelial lesions and invasive cancer. Nevertheless, other HLA class II haplotypes have been considered protective factors. (4-5)

Oral contraceptive use is also thought to increase the risk of cervical neoplasia, but evidence remains inconsistent. Moreover, early pregnancy (before the age of 17 years) was linked to a two-fold increase in cervical cancer when compared to pregnancy after the age of 25 years. Family history of cervical neoplasia is also a well-known risk factor. Additionally, low income has been linked to cervical cancer incidence rates, considering that the limited access to health care may prevent the early detection and treatment of precancerous lesions. (3, 6)

Early cervical cancer is classified by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) as a tumor confined to the cervix, measuring  $\leq 4$  cm. (7) Pre-invasive cervical lesions can be detected by screening programs and can often be prevented before progression to invasive disease. When invasive disease is established, primary treatment is based on the clinical staging at diagnosis and usually consists of definitive surgery (radical hysterectomy or radical trachelectomy) or radiotherapy (with or without chemotherapy) for those patients who are not eligible for surgery. Potential risk factors for late diagnosis have been related to reduced access to health care, sociodemographic factors, and cultural aspects. (8-9)

Currently, international discussions emphasize the need to reduce the disparity in access to health care among different populations. In this way, the understanding of factors that may interfere within the evolution of cervical cancer and that can lead to late stage diagnosis is a crucial aspect that deserves further investigation. Thus, the present study was aimed at investigating the association between clinical and sociodemographic variables with the late diagnosis of cervical cancer in women treated at cancer reference hospital in Northeast Brazil.



## METHODS

A retrospective epidemiological study was carried out and included cases of cervical cancer diagnosed in women who attended the Aldenora Bello Hospital (São Luís, Brazil), from January 2009 to December 2012. Inclusion criteria comprised age > 17 years, the presence of a primary cervical tumor, and absence of a prior treatment for cancer. Patients that presented with a tumor *in situ* or recurrence of a previous tumor, and those who reported a prior treatment for cancer or whose data could not be obtained from medical records were excluded from the study.

From a total of 3120 patients, 6 were excluded because there was no confirmation of the diagnosis of cervical cancer by histopathological evaluation, the patient had undergone a previous treatment for cancer, or due to missing data in the medical records. For data analysis, clinical staging followed FIGO (10) classification and histological types of tumors were obtained from patients' medical records. The clinical staging at diagnosis was considered for the whole sample.

Data were collected from medical records of patients and comprised the following information: age, educational level, skin color, cancer staging, histological type, initial treatment, family history of cancer, smoking and alcohol use. The ages were categorized in pre-established age groups, facilitating data interpretation.

The software Stata 14.0 (StataCorp, College Station, TX, USA) was used for statistical analysis. Descriptive analysis was conducted, including absolute and relative frequencies. Values for "no information" and "not applicable" cases were included in the calculation. To investigate any associations among variables, the Pearson's chi squared test was used at a 5% significance level. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Maranhão.

## RESULTS

In total, 3114 women, aged 17-95 years (mean age:  $52 \pm 14$  years) and diagnosed with cervical cancer during the period 2006-2012, were included in the study. The majority of patients (56.71%) reported non-white skin color (quilombola and indigenous). As for the educational level, most patients (32.34%) had incomplete elementary education. In relation to the marital situation, 33.14% of patients were single and 49.84% married. Regarding smoking habits, most patients (35.10%) had never smoked, 8.48% were former smokers and 18.46% were current smokers. Alcohol use was mentioned by 11.14% of patients, whereas 44.51% of them had never consumed alcohol and 2.47% were former users.

Most patients had no family history of cancer (30.76%). Regarding the histopathological type of the tumor, 75.98% of patients had squamous cell carcinoma, 5.78% had adenocarcinoma and 18.24% presented with another type of tumor. Stage II was the most prevalent (32.34%),

followed by stage III (28.71%), stage I (14.39%), stage IV (6.84%) and 0 (6.52%). It was observed that 52.09% of patients underwent chemoradiotherapy as initial treatment, followed by surgery (19.20%) and radiotherapy (11.59%) (Table 1).

Table 2 shows that the variables skin color and educational level were significantly associated with staging ( $p < 0.05$ ), but there was no association of staging with either age range or marital status ( $p > 0.05$ ). Over half of the women in both early (57.66%) and late stages (53.93%), were non-white ( $p < 0.001$ ). On the other hand, the white race corresponded to 9.59% in early staging and 13.91% in late staging. Regarding the educational level, most patients had incomplete elementary education in both early (33.84%) and late (34.60%) stages ( $p < 0.002$ ) (Table 2)

Lastly, in univariate analysis, the histopathological type of tumor was associated with cancer staging ( $p < 0.001$ ), considering that early staging corresponded to 73.76% and advanced staging represented 91.69% of all squamous cell carcinoma identified. Disease free was the outcome with the highest frequency as 65.80% of patients showed complete remission of tumor in early staging and 32.79% in advanced staging as shown in Table 3 ( $p < 0.001$ ).

## DISCUSSION

In the present study, skin color, educational level and histologic type of tumor were associated with advanced staging at diagnosis of cervical cancer. This may also affect the outcome of disease. Recent evidence has shown that non-white women are less likely to receive timely treatment and more likely to be diagnosed with advanced-stage cervical cancer. (11) Other factors that are also involved in the late diagnosis of cervical cancer include low schooling, HIV positive, high parity and non-use of condoms. (12) The educational level may be an important demographic parameter for surveillance of populations at risk for cervical cancer. (13) Notably, most patients from our population sample had incomplete elementary education (32.34%).

In our study, most patients were non-white. Although evidence demonstrates a greater decrease (-3.0%) in cervical cancer incidence rates in black women as compared to white women (-1.9%) in the past decade, black women continue to show higher rates of cervical cancer incidence compared to white women (10.4 vs 7.8 per 100,000 population). Black women also have higher rates of cervical cancer mortality (4.3 per 100,000) than any other racial group. (14) One of possible the explanations for that is a complex interaction between biological, socioeconomic and cultural factors. (15) Notably, the mortality rate of white women was shown to decrease after 40 years of age, whereas that of black women increases with advanced age. (16) In this study, the majority of women were aged 44-56 years (33.85%), followed by 31-43 (25.14%) and 57-69 (24.12%), which in agreement with prior reports.



Over the years, it has been well established that smoking increases the risk of cervical cancer, especially squamous cell carcinoma and in women positive for HPV. (17) Tobacco-specific nitrosamines derived from nicotine have been identified in the uterine cervix, and they may cause genotoxic damage to cervical cells. Smoking also locally affects cervical immune mechanisms, reducing the number of Langerhans and other immune cells. (18, 19) In our study, a high number of patients (18.46%) smoked, but the majority of them (35.10%) had never smoked. In regard to former smokers (8.48%), significant regression rates of precancerous cervical lesions were shown in women who had ceased smoking compared to those who continued to smoke. (20)

Single marital status has been associated with higher mortality rates for various types of cancers, such as breast, colorectal, ovarian and endometrial cancer. Recent evidence that evaluated the effect of marital status on survival of cervical cancer patients has shown that single women are at increased risk of death from cervical cancer. (21) In terms of prevention, married women have a lower risk of developing cervical cancer as compared to single women (22) In our study, 49.84% of patients were married, followed by 33.14%, 11.75% and 3.37% that were single, widowed and divorced respectively.

Regarding histological types of cervical cancer tumors, squamous cell carcinomas represent 70% of the cases, adenocarcinomas 25%, and adenosquamous carcinomas 3% to 5%. Adenosquamous carcinoma exhibits glandular and squamous differentiation and presents a worse prognosis than squamous cell carcinomas or adenocarcinomas. (23) Comparing our results to those presented in the literature, this study has similar findings, with 75.98% of cases being squamous cell carcinomas and 5.78% being adenocarcinomas.

The treatment of cervical cancer usually includes chemotherapy and radiotherapy or radical hysterectomy with early stage lymph node dissection and chemoradiotherapy in advanced stage. In many institutions, patients experience a long delay between diagnosis and initiation of treatment, usually explained by the lack of access to the health system. (24, 25) In our study, most patients had as initial treatment radiotherapy and chemotherapy (52.09%), followed by surgery (19.2%) and radiotherapy (11.59%). Different findings have been observed in other countries. In the U.S., regional disease or distant metastasis at diagnosis were shown in 44% of the women investigated. (26)

This study has some limitations, including secondary database, which might contain information bias, especially regarding the histological classification and clinical staging of tumors, which used the FIGO classification system for cervical cancer, whose staging parameters rely on the physician's experience. In addition, other risk factors could not be evaluated due to lack of information in the database consulted.

In conclusion, the diagnosis of cervical cancer occurred late in all age groups in the present study. Although the main factor associated with advanced staging of cervical cancer was the histologic type (squamous cell carcinoma), disparities in educational level may also affect incidence rates. Still, a higher number of cases was identified in non-white women. Thus, our findings show a population subgroup that deserves further attention targeting cervical cancer prevention.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

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

#### **CONFLICTS OF INTEREST**

There are no conflicts of interest.

#### **REFERENCES**

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer.* 2015;136(5):E359-86.
3. Nartey Y, Hill PC, Amo-Antwi K, Nyarko KM, Yarney J, Cox B. Cervical Cancer in the Greater Accra and Ashanti Regions of Ghana. *Journal of global oncology.* 2017;3(6):782-90.
4. Khieu M, Butler SL. Cancer, Squamous Cell, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HGSIL). *StatPearls. Treasure Island (FL)2017.*
5. Brianti P, De Flammoneis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *The new microbiologica.* 2017;40(2):80-5.
6. Aguiar Jr. PN, Stock GT, Lopes Jr. GdL, Almeida MSd, Tadokoro H, Gutierrez BdS, et al. Disparities in cancer epidemiology and care delivery among Brazilian indigenous populations. *Einstein (São Paulo).* 2016;14:330-7.
7. Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics.* 2009;105(2):107-8.
8. Zigras T, Lennox G, Willows K, Covens A. Early Cervical Cancer: Current Dilemmas of Staging and Surgery. *Current oncology reports.* 2017;19(8):51.



9. Wang F, Luo L, McLafferty S. Healthcare access, socioeconomic factors and late-stage cancer diagnosis: an exploratory spatial analysis and public policy implication. *International journal of public policy*. 2010;5(2-3):237-58.
10. Oncology FCoG. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2014;125(2):97-8.
11. Markt SC, Tang T, Cronin AM, Katz IT, Howitt BE, Horowitz NS, et al. Insurance status and cancer treatment mediate the association between race/ethnicity and cervical cancer survival. *PloS one*. 2018;13(2):e0193047.
12. Stewart TS, Moodley J, Walter FM. Population risk factors for late-stage presentation of cervical cancer in sub-Saharan Africa. *Cancer epidemiology*. 2018;53:81-92.
13. Krishnatreya M, Katakaci AC, Sharma JD, Nandy P, Gogoi G. Association of educational levels with survival in Indian patients with cancer of the uterine cervix. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(8):3121-3.
14. Yoo W, Kim S, Huh WK, Dilley S, Coughlin SS, Partridge EE, et al. Recent trends in racial and regional disparities in cervical cancer incidence and mortality in United States. *PloS one*. 2017;12(2):e0172548.
15. Weragoda J, Azuero A, Badiga S, Bell WC, Matthews R, Piyathilake C. An examination of racial differences in 5-year survival of cervical cancer among African American and white American women in the southeastern US from 1985 to 2010. *Cancer medicine*. 2016;5(8):2126-35.
16. Markowitz LE, Hariri S, Lin C, Dunne EF, Steinau M, McQuillan G, et al. Reduction in human papillomavirus (HPV) prevalence among young women following HPV vaccine introduction in the United States, National Health and Nutrition Examination Surveys, 2003-2010. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(3):385-93.
17. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX, et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer causes & control : CCC*. 2003;14(9):805-14.
18. Cerqueira EM, Santoro CL, Donozo NF, Freitas BA, Pereira CA, Bevilacqua RG, et al. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? *Acta cytologica*. 1998;42(3):639-49.
19. Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecologic and obstetric investigation*. 1995;39(1):34-8.

20. Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ, et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet*. 1996;347(9006):941-3.
21. Machida H, Eckhardt SE, Castaneda AV, Blake EA, Pham HQ, Roman LD, et al. Single Marital Status and Infectious Mortality in Women With Cervical Cancer in the United States. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2017;27(8):1737-46.
22. Haile ZT, Kingori C, Chavan B, Francescon J, Teweldeberhan AK. Association Between Risky Sexual Behavior and Cervical Cancer Screening Among Women in Kenya: A Population-Based Study. *Journal of community health*. 2017.
23. Look KY, Brunetto VL, Clarke-Pearson DL, Averette HE, Major FJ, Alvarez RD, et al. An analysis of cell type in patients with surgically staged stage IB carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1996;63(3):304-11.
24. Perri T, Issakov G, Ben-Baruch G, Felder S, Beiner ME, Helpman L, et al. Effect of treatment delay on survival in patients with cervical cancer: a historical cohort study. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2014;24(7):1326-32.
25. Yun YH, Kim YA, Min YH, Park S, Won YJ, Kim DY, et al. The influence of hospital volume and surgical treatment delay on long-term survival after cancer surgery. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(10):2731-7.
26. Leyden WA, Manos MM, Geiger AM, Weinmann S, Mouchawar J, Bischoff K, et al. Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(9):675-83.

**Table 1.** Sociodemographic and clinical characteristics of women diagnosed with cervical cancer at Aldenora Bello Hospital, São Luís, Brazil, 2006-2012.

<b>Variables</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Age range (years)</b>		
17-30	150	4.82
31-43	783	25.14
44-56	1054	33.85
57-69	751	24.12
70-82	323	10.37
83-95	53	1.70
<b>Skin color</b>		
White	341	10.95

Non-white	1766	56.71
Not informed	1007	32.34
<b>Educational level</b>		
Incomplete primary school	1007	32.34
Complete primary school	293	9.41
Complete secondary school	270	8.67
Higher education (incomplete)	2	0.06
Higher education (complete)	39	1.25
None	370	11.88
Not informed	1133	36.38
<b>Marital status</b>		
Single	1032	33.14
Married	1552	49.84
Widowed	366	11.75
Divorced	105	3.37
Stable union	14	0.45
Not informed	45	1.45
<b>Family history of cancer</b>		
Yes	585	18.79
No	958	30.76
Not informed	1571	50.45
<b>Alcohol use</b>		
No	1386	44.51
Former user	77	2.47
Yes	347	11.14
Not evaluated	326	10.47
Not applicable	1	0.03
Not informed	977	31.37
<b>Tobacco use</b>		
No	1093	35.10
Former user	264	8.48
Yes	575	18.46
Not evaluated	267	8.57
Not applicable	4	0.13
Not informed	911	29.25

<b>Histologic type</b>		
Squamous cell carcinoma	2366	75.98
Adenocarcinoma	180	5.78
Other	568	18.24
<b>Staging</b>		
0	203	6.52
I	448	14.39
II	1007	32.34
III	894	28.71
IV	213	6.84
Not applicable	55	1.76
Not informed	294	9.44
<b>Initial treatment</b>		
None	117	3.76
Surgery	598	19.20
Radiation therapy	361	11.59
Chemotherapy	63	2.02
Surgery and radiation therapy	125	4.01
Surgery and chemotherapy	19	0.61
Chemoradiotherapy	1622	52.09
Surgery and Chemoradiotherapy	204	6.55
Other	5	0.16

Table 2: Association between staging and sociodemographic characteristics of women diagnosed with cervical cancer at Aldenora Bello Hospital, 2006-2012.

Variable	Category	Staging								p-value
		Early (0, I e II)		Late (III e IV)		Not applicable		No information		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Age range (years)	17-30	61	3.68	50	4.52	4	7.27	35	11.90	0.433
	31-43	404	24.37	259	23.40	17	30.91	103	35.03	
	44-56	559	33.72	389	35.14	18	32.73	88	29.93	
	57-69	433	26.12	259	23.40	12	21.82	47	15.99	

	70-82	174	10.49	129	11.65	3	5.45	17	5.78			
	83-95	27	1.63	21	1.90	1	1.82	4	1.36			
	Total	1658	100	1107	100	55	100	294	100			
Skin color	White	159	9.59	154	13.91	4	7.27	24	8.16	<0.001*		
	Non-white	956	57.66	597	53.93	35	63.64	178	60.54			
	No information	543	32.75	356	32.16	16	29.09	92	31.29			
	Total	1658	100	1107	100	55	100	294	100			
Educational level	None	172	10.37	165	14.91	6	10.91	27	9.18	0.002*		
	Incomplete primary school	561	33.84	383	34.60	23	41.82	40	13.61			
	Complete primary Fundamental Incomplete secondary school	186	11.22	97	8.76	8	14.55	2	0.68			
	Complete secondary school	153	9.23	99	8.94	6	10.91	12	4.08			
	Incomplete higher education	0	0	2	0.18	0	0.00	0	0.00			
	Complete higher education	24	1.45	11	0.99	1	1.82	3	1.02			
	No information	562	33.90	350	31.62	11	20.00	210	71.43			
	Total	1658	100	1107	100	55	100	294	100			
	Marital status	Single	545	32.87	366	33.06	23	41.82	98		33.33	0.383
		Married	845	50.97	533	48.15	26	47.27	148		50.34	
Widow		190	11.46	145	13.10	5	9.09	26	8.84			
Divorced		55	3.32	43	3.88	0	0.00	7	2.38			
Stable union		6	0.36	7	0.63	0	0.00	1	0.84			
No information		17	1.03	13	1.17	1	1.82	14	4.76			
Total		1658	100	1107	100	55	100	294	100			

Table 3: Association between staging and clinical characteristics of women diagnosed with cervical cancer at Aldenora Bello Hospital, 2006-2012.

Variable	Category	Staging								p-value
		Early (0, I e II)		Late (III e IV)		Not applicable		No information		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Histologic type	Squamous cell carcinoma	1233	73.76	1015	91.69	36	65.45	92	31.29	<0.001*
	Adenocarcinoma	128	7.72	42	3.79	3	5.45	7	2.38	
	Other	307	18.52	50	4.52	16	29.09	195	66.33	
	Total	1658	100	1107	100	55	100	294	100	
Outcome	Disease free	1091	65.80	363	32.79	12	21.82	209	71.09	<0.001*
	Partial remission	206	12.42	200	18.07	2	3.64	1	1.34	
	No progression	120	7.24	114	10.30	0	0.00	4	1.36	
	In progression	43	2.59	129	11.65	0	0.00	1	0.34	
	Palliative care	3	0.18	15	1.36	0	0.00	0	0.00	
	Death	42	2.53	133	12.01	40	72.73	54	18.37	
	Not applicable	41	2.47	59	5.33	0	0.00	21	7.14	
	No information	112	6.76	94	8.49	1	1.82	4	1.36	
Total	1658	100	1107	100	55	1000	294	100		



Covering Letter

March 19, 2018

Editor-in-Chief,  
European Journal of Cancer Prevention

Dear Editor,

Please find attached the manuscript "**Geographic disparity of cervical cancer: Association with age, ethnicity/race and histopathological findings**", which we hope you find suitable for publication in *European Journal of Cancer Prevention* as a original article. We consider that the present article would be an important contribution to the literature since there is a shortage of epidemiological data regarding cervical cancer patients in Brazil.

I declare that the above-mentioned manuscript has not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere. I also declare that the manuscript has been read and approved by all authors in the same way it was submitted to *European Journal of Cancer Prevention*.

We are grateful for the consideration to our manuscript for publication in *European Journal of Cancer Prevention*. Please we would appreciate a prompt reply by e-mail (cnsd\_ma@uol.com.br).

Best regards,

M.D.S.B. Nascimento, MD, MS, PhD

Corresponding author:

Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, Chair Professor, Department of Pathology, Federal University of Maranhão.

Postgraduate Program in Adult Health, Federal University of Maranhão. Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga, São Luís, MA, 65080-805, Brazil.

E-mail: cnsd\_ma@uol.com.br

Phone: +55 98 32729520

## Anexo E: Normas da Revista European Journal of Cancer Prevention

### European Journal of Cancer Prevention Online Submission and Review System

#### Author Resources

Guidance for Authors (this page)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

#### Guidance for Authors on the Preparation and Submission of Manuscripts to European Journal of Cancer Prevention

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the "Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals" at [www.icmje.org](http://www.icmje.org).

The Journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) which aims to define best practice in the ethics of scientific publishing. COPE has established a number of guidelines including a Code of Conduct, and created flow charts that help editors process cases of suspected misconduct ([www.publicationethics.org](http://www.publicationethics.org)).

Appeals on editorial decision should be sent to the Editor. Complaints related to how your paper was processed during peer-review and not resolved by the Editor, should be referred to the person named as publisher in "About the Journal" under "Journal Info" contacts (<http://journals.lww.com/eurjcancerprev/Pages/aboutthejournal.aspx>), or if unsatisfied to COPE ([www.publicationethics.org](http://www.publicationethics.org)).

#### AIMS AND SCOPE

With its fast publication of the latest developments and discoveries in this important field of medicine, the *European Journal of Cancer Prevention* aims to promote an increased awareness of all aspects of cancer prevention and to stimulate new ideas and innovations. The journal has a wide-ranging scope, covering such aspects as descriptive and metabolic epidemiology, histopathology, lifestyle issues, environment, genetics biochemistry, molecular biology, microbiology, clinical medicine, intervention trials and public education, basic laboratory studies and special group studies. Although affiliated to a European organization, the *European Journal of Cancer Prevention* addresses issues of international importance.

#### SUBMISSIONS

Authors are required to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://www.editorialmanager.com/ejcp/>. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office. Submitted articles undergo a preliminary review by the editor. Some articles may be returned to authors without further consideration. Those being considered for publication will undergo further assessment and peer-review by the editor and those invited to do so from the board and reviewer pool. Papers submitted by the Editor, Associate Editors or Board members are reviewed independently of that editor and board member.



Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: title page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the Title Page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided.

## **ARTICLE TYPES**

### ***Research paper***

Research papers are the core of the journal. They describe in a well-defined format the background, materials, methods, results of a state-of-the art scientific study with appropriate discussion of the results. It should be no longer than 3000 words in the body of the paper.

### ***Short paper***

New findings which merit quick dissemination; 1,200 words of text with no more than 2 inserts (figures/tables) and 10 references. The format is similar to a research paper, only shorter.

### ***Opinion***

Is a short paper that reflects the personal scientific opinion of one or more individuals.

### ***Editorial***

An editorial is an opinion paper written by members of the Editorial Staff or scientists appointed by members of the Editorial Staff. Usually it should not exceed 1200 words.

### ***Rapid Communication***

A short paper on an actual and timely issue, which necessitates expedience.

### ***Review Article***

A review paper summarizes the current and complete knowledge of a topic

### ***Short papers***

New findings which merit quick dissemination; 1,200 words of text with no more than 2 inserts (figures/tables) and 10 references.

### ***Letter to the Editor***

Is an opinion message to the editor not longer than 250 words and maximal 5 references.

Articles are considered for publication on the understanding that neither the article nor its essential substance has been or will be published elsewhere before appearing in the *European Journal of Cancer Prevention*. Abstracts and press reports published in connection with scientific meetings are not considered to be prepublications. COPE have produced a useful reference document on the responsibility of authors for their submissions entitled "International standards for authors" at <http://publicationethics.org/resources>

## **POINTS TO CONSIDER WHEN SUBMITTING YOUR PAPER TO ONE OF OUR JOURNALS**

Please think carefully about the following points and make the appropriate declarations.

### **Redundant or duplicate publication**

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The International Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not duplicate or redundant publication ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site, or an abstract of your work), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. In your covering letter to the editors, draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper.

### **Conflicts of interest**

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding:". For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker's bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, ([www.icmje.org/update.html](http://www.icmje.org/update.html)). The copyright agreement is included in the Author Questionnaire, completed by the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with a link to the questionnaire upon submission.

### **Permissions to reproduce previously published material**

Authors should include with their submission copies of written permission to reproduce material published elsewhere (such as illustrations) from the copyright holder. Authors are responsible for paying any fees to reproduce material.

### **Patient consent forms**

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying details (written or photographic) should be omitted if they are not essential, but patient data should never be altered or falsified in an attempt to attain anonymity. Complete anonymity is difficult to achieve, and a consent form should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

### **Ethics committee approval**

You must state clearly in your submission in the Methods section that you conducted studies on human participants must with the approval of an appropriate named ethics committee. Please also look at the latest version of the Declaration of Helsinki. Clinical studies should be in accordance with the latest publication of 'Good Clinical Practice ([www.who.int/iris/handle/10665/43392](http://www.who.int/iris/handle/10665/43392))'. Similarly, you must confirm that experiments involving animals adhered to ethical standards and must state the care of animal and licensing guidelines under which the study was performed.

### **Authorship**

All authors must sign the letter accompanying their submission to confirm that they have read and approved the paper, that they have met the criteria for authorship as established by the International Committee of Medical Journal Editors, that they believe that the paper represents honest work, and that they are able to verify the validity of the results reported.

### **Open access**

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The article processing charge (APC) is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by the author, funding agency or institution. Payment must be processed for the article to be published open access. For a list of journals and pricing please visit our [Wolters Kluwer Open Health Journals page](#).

### ***Authors retain copyright***

Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant Wolters Kluwer an exclusive license to publish the article and the article is made available under the terms of a Creative Commons user license. Please visit our [Open Access Publication Process page](#) for more information.

### ***Creative Commons license***

Open access articles are freely available to read, download and share from the time of publication under the terms of the [Creative Commons License Attribution-NonCommercial No Derivative \(CC BY-NC-ND\) license](#). This license does not permit reuse for any commercial purposes nor does it cover the reuse or modification of individual elements of the work (such as figures, tables, etc.) in the creation of derivative works without specific permission.

### ***Compliance with funder mandated open access policies***

An author whose work is funded by an organization that mandates the use of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\) license](#) is able to meet that requirement through the available open access license for approved funders. Information about the approved funders can be found here: <http://www.wkopenhealth.com/inst-fund.php>

### ***FAQ for open access***

<http://www.wkopenhealth.com/openaccessfaq.php>

**Copyright assignment**

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to complete the online form during the submission process. They may use material from their paper in other works published by them after seeking formal permission.

**PRESENTATION OF PAPERS****Title Page**

The Title Page should carry the full title of the paper and a short title, of no more than 45 characters and spaces, to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the Title Page, as should the name and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the Title Page should include a statement of conflicts of interest and source of funding, and when none state "none declared".

**Abstracts**

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations.

**Key Words**

The abstract should be followed by a list of 3–10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

**Text**

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

**Acknowledgements**

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

**References**

References are to be cited in the text by author and year, as Black and White (1991) or (Black and White, 1991). A series of references in the text should appear in chronological order, e.g. White and Black, 1989; Black and White, 1991. References having three or more authors are cited Black et al., (1991). References to papers by the same authors in the same year are distinguished by letters a, b, etc. (e.g. 1988a,b). Publications having no obvious authors are cited as Anon, (1991) in the text and bibliography. References in the bibliography with three or more authors should be placed in

chronological order after taking account of the names of the first and second authors. References in the bibliography should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in MEDLINE (NLM Catalog, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>). Some sample reference styles follow:

#### Articles in journals

##### *Standard journal article:*

Simopoulos AP. The traditional diet of Greece and cancer. *Eur J of Cancer Prev* 2004;**13**:219-230.

##### *More than six authors:*

Zhang LR, Chiarelli AM, Glendon G, Mirea L, Edwards S, Knight JA, et al. (2011). Influence of perceived breast cancer risk on screening behaviors of female relatives from the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Eur J of Cancer Prev* **20**:255-262.

##### *Supplements:*

Viguiet J. (2011). Cancer screening: more information, more action, more benefits. *Eur J of Cancer Prev* **20** (Suppl 1):S2-S4.

#### Books

##### *Book:*

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

##### *Chapter in a book:*

Restifo NP, Wunderlich JR. (2005). Cancer Immunology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: pp. 139-161.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

#### **Tables**

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text. If you use a table or data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

#### **Illustrations**

##### **A) Creating Digital Artwork**

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork: <http://links.lww.com/ES/A42>

2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

### **B) Digital Artwork Guideline Checklist**

Here are the basics to have in place before submitting your digital artwork:

- Artwork should be saved as JPEG, TIFF, EPS, or MS Office (DOC, PPT, XLS) files. High resolution PDF files are also acceptable.
- Crop out any white or black space surrounding the image.
- Please use either Arial or Helvetica font size 7 for any text or labels within illustrations.
- Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If created in an MS Office program, send the native (DOC, PPT, XLS) file.
- Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
- Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
- Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

### **Remember:**

- Cite figures consecutively in your manuscript using Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2).
- Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
- Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and enter figure numbers consecutively in the Description field when uploading the files.
- Illustrations should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm.
- Photomicrographs must have internal scale markers.
- If photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph.
- If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain.
- Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

### **Legends for illustrations**

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate sheet of paper. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

### **Units of measurement**

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

### **Abbreviations and symbols**

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

### **Supplemental Digital Content**

**Supplemental Digital Content (SDC):** Authors may submit SDC via Editorial Manager to LWW journals that enhance their article's text to be considered for online posting. SDC may include standard media such as text documents, graphs, audio, video, etc. On the Attach Files page of the submission process, please select Supplemental Audio, Video, or Data for your uploaded file as the Submission Item. If an article with SDC is accepted, our production staff will create a URL with the SDC file. The URL will be placed in the call-out within the article. SDC files are not copy-edited by LWW staff, they will be presented digitally as submitted. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

#### **SDC Call-outs**

Supplemental Digital Content must be cited consecutively in the text of the submitted manuscript. Citations should include the type of material submitted (Audio, Figure, Table, etc.), be clearly labeled as "Supplemental Digital Content," include the sequential list number, and provide a description of the supplemental content. All descriptive text should be included in the call-out as it will not appear elsewhere in the article.

Example:

We performed many tests on the degrees of flexibility in the elbow (see Video, Supplemental Digital Content 1, which demonstrates elbow flexibility) and found our results inconclusive.

#### **List of Supplemental Digital Content**

A listing of Supplemental Digital Content must be submitted at the end of the manuscript file. Include the SDC number and file type of the Supplemental Digital Content. This text will be removed by our production staff and not be published.

Example: Supplemental Digital Content 1.wmv

**SDC File Requirements** All acceptable file types are permissible up to 10 MBs. For audio or video files greater than 10 MBs, authors should first query the journal office for approval. For a list of all available file types and detailed instructions, please visit <http://links.lww.com/A142>.

#### **Offprints**

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.