



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



**ESTUDO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 18 E
VARIANTES ASSOCIADAS AO CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS, SÃO LUÍS - MA**

GERUSINETE RODRIGUES BASTOS DOS SANTOS

**São Luís - MA
2018**

GERUSINETE RODRIGUES BASTOS DOS SANTOS

**ESTUDO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 18 E
VARIANTES ASSOCIADAS AO CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS, SÃO LUÍS - MA**

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; Doenças Infecciosas e Endêmicas no Maranhão.

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

Santos, Gerusinete Rodrigues Bastos dos.

ESTUDO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO HPV 18 E VARIANTES ASSOCIADAS AO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS, SÃO LUÍS - MA / Gerusinete Rodrigues Bastos dos Santos. - 2018.

134 p.

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

Coorientador(a): Zulmira da Silva Batista.

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

1. Câncer do colo do útero. 2. HPV 18. 3. Papilomavírus humano. 4. Variantes. I. Batista, Zulmira da Silva. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares Brandão. III. Título.

GERUSINETE RODRIGUES BASTOS DOS SANTOS

**ESTUDO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) 18 E
VARIANTES ASSOCIADAS AO CÂNCER DO COLO DO
ÚTERO EM USUÁRIAS DA REDE SUS, SÃO LUÍS - MA**

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: **15 / 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. Flávia Castello Branco Vidal
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

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

Prof. Dr. José Eduardo Batista
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Miguel Caldas Bastos e Bernarda Rodrigues Bastos (*in memoriam*), com todo o meu amor e gratidão a eles que são minha fonte maior de orgulho, motivação e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da vida e amor eterno.

A minha família, em especial ao meu querido marido Flávio Rodrigues, pelo apoio imensurável em todos os momentos, as minhas maravilhosas filhas Flávia e Bianca pelo amor incondicional e compreensão nos momentos de ausência, a minha sobrinha Valéria e minhas queridas irmãs pelo apoio constante.

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 (PPGSAD) (Medicina II/CAPES – Mestrado Acadêmico) 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 Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão da UFMA, em especial a Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito, Profa. Dra. Maria Bethania da Costa Chein, a Profa. Dra. Flavia Castello Branco Vidal, a Profa. Dra. Zulmira da Silva Batista e a Profa. Dra. Sally Cristina Moutinho Monteiro os meus agradecimentos. Gratidão a mestranda Ana Paula Cunha e a profissional Jucileide Mota pela ajuda e amizade a todo momento.

Ao meu amigo, Prof. Dr. José Eduardo Batista do Departamento de Patologia/UFMA, pela amizade, apoio e incentivo ao ingresso à pós-graduação.

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 18.

Agradecimentos à Profa. Flavia Castello Branco Vidal pelo incentivo ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Paulo Castello Branco Vidal Bolsista de Pós-Doutorado do PPGSAD-UFMA, pela colaboração no entendimento de variantes do HPV.

A todos os amigos da Turma 13 do PPGSAD, em especial ao amigo Mestrando Rodrigo Lopes da Silva, meu parceiro nesta pesquisa e as amigas Francisca Bruna Arruda Aragão e Clíce Pimentel Cunha de Sousa pela amizade, apoio, compreensão nas longas horas de estudo.

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), Liwerbeth dos Anjos Pereira, Lailson Oliveira de Castro, pelo companheirismo e apoio.

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

.À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo fomento concedido à 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) 18.

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

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

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. Aproximadamente 70 a 80% deste câncer está associado com os tipos de Papilomavírus Humano (HPV 16 e 18). Diversos estudos relatam a diversidade intratipo de HPV associados com a progressão da infecção para o câncer invasivo, podendo interferir biologicamente e etiologicamente no desenvolvimento do câncer do colo do útero. Dentre os tipos virais, o HPV 18 apresenta elevada oncogenicidade e é o segundo tipo mais prevalente em tumores cervicais. **Objetivos:** Objetivou-se analisar as variantes intratipo de Papilomavírus Humano 18 em amostras de câncer de colo de útero em mulheres assistidas em São Luís – MA. **Métodos:** Dados sócio-demográficos foram obtidos através de questionários aplicados às pacientes. Fragmentos tumorais do 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 18, amostras positivas foram submetidas a PCR utilizando primers específicos para amplificação das regiões LCR e E6 do vírus HPV 18. **Resultados:** Foram analisados os dados de 120 pacientes com câncer do colo do útero (CCU). A maioria das mulheres estavam na faixa etária entre 40 a 49 anos (34/28.33%), possuíam escolaridade até o ensino fundamental (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-demográficas e associadas a fatores de risco para o câncer do colo do útero ($p < 0.05$). O HPV esteve presente em 88 mulheres (73.33%). Os tipos prevalentes foram o HPV 16 (48/54.0%), o HPV 18 (12/13.7%), o HPV 35 (6/6.9%) e o HPV 45 (5/5.7%). Dentre as 12 amostras positivas para HPV 18, em 10 foi identificada a variante A (80%) e em 2 foi identificada a variante B (20%). O tipo histológico de maior prevalência em tumores com HPV 18 foi o carcinoma epidermóide em 6 amostras (50.0%), seguido pelo adenocarcinoma em 3 amostras (25%). **Conclusão:** O conhecimento das variantes do HPV 18 fornecerá referência para a classificação filogenética das sublinhagens com relevância biológica e epidemiológica em câncer do colo do útero no Maranhão.

Palavras-chaves: Câncer do colo do útero; Papilomavírus humano; HPV 18; Variantes.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the fourth most common type of cancer affecting women worldwide, with more than 80% of cases occurring in developing countries. Approximately 70 to 80% of this cancer is associated with Human Papillomavirus (HPV 16 and 18). Several studies report the intra-type diversity of HPV associated with the progression of infection to invasive cancer and may interfere biologically and etiologically in the development of cervical cancer. Among viral types, HPV 18 shows high oncogenicity and is the second most prevalent type in cervical tumors. **Objective:** The goal of this study was to analyze the intra-type variants of HPV 18 in samples of cervical cancer in women assisted in São Luís - MA. **Method:** Socio-demographic data were obtained through questionnaires applied to the patients. Tumor fragments from the cervix were collected and submitted to DNA extraction, and later Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed to detect HPV. The Nested PCR technique was performed using primers PGMY09/11 for the first round and GP + 5/6 for the second round. Positive samples were submitted to an automated sequencing technique for viral genotyping. To characterize the HPV 18 strains, positive samples were submitted to PCR using specific primers for amplification of the HPV 18 virus LCR and E6 regions. **Results:** Data from 120 patients with cervical cancer were analyzed. Most of the women were between 40 and 49 years of age (34 / 28.33%), had primary schooling (51 / 42.50%), family income between 1 and 2 minimum wages (66/55%) and were married/consensual union (62 / 51.67%). There was no statistically significant association between HPV and socio-demographic variables and risk factors for cervical cancer ($p < 0.05$). HPV was present in 88 women (73.33%). The most prevalent types were HPV 16 (48 / 54.0%), HPV 18 (12 / 13.8%), HPV 35 (6 / 6.9%) and HPV 45 (5 / 5.7%). Among the 12 samples positive for HPV 18, in 10 the variant A was identified (80%) and in 2 the variant B was identified (20%). The most prevalent histological type in HPV 18 tumors was epidermoid carcinoma in 6 samples (50.0%), followed by adenocarcinoma in 3 samples (25%). **Conclusion:** Knowledge of HPV 18 variants will provide a reference for the phylogenetic classification of biologically and epidemiologically relevant underlines in cervical cancer in the state of Maranhão.

Keywords: Cervical cancer; Human papillomavirus; HPV 18; Variants.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer)
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISTs	Infecções Sexualmente Transmissíveis
JEC	Junção Escamo-Colunar
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região de Controle Longa)
LSIL	<i>Low-Risk Squamous Intraepithelial Lesion</i> (Lesão intra-epitelial escamosa de baixo risco)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas).
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NMI	Neoplasia Maligna Indiferenciada
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i> (Quadros de leitura aberta)
P53	Proteína de 53kD
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polymerase)
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por emissão de positrons)
pRb	Proteína do Retinoblastoma
RM	Ressonância Magnética
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TNM	Classificação de Tumores Malignos
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UICC	Union for International Cancer Control (União para o Controle Internacional do Câncer)
UNACON	Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia

WHO

World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

ZT

Zona de Transição

LISTA DE QUADROS

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) 54

Quadro 2: Primers utilizados para PCR para amplificação de sequências de LCR e E6 do HPV 18, temperatura de anelamento e posição nas sequencias genômicas de referências. (Adaptado de: VIDAL *et al* (2016) 58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: 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)	21
Figura 2: Modelo de progressão do carcinoma cervical e fatores de risco (Adaptado de: WENTZENSEN, 2016)	26
Figura 3: (A) Representação esquemática do colo do útero humano. (B) Corte histológico do colo. (Adaptado de: HERFS <i>et al</i> , 2012)	28
Figura 4: Estadiamento TNM para identificação do grau de extensão do câncer adaptado de: TNM da American Joint Committee on Cancer (AJCC) (WITTEKIND; ASSAMURA; SOBIN, 2014)	31
Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV. (Adaptado de: MUÑOZ <i>et al.</i> , 2006)	34
Figura 6: Árvore filogenética do HPV. (Adaptado de: MA <i>et al.</i> , 2014)	38
Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de infecção do HPV no epitélio cervical. (Adaptado de: DOORBAR 2006)	41
Figura 8: Classificação histórica das variantes de HPV 18. (Adaptado de ONG <i>et al.</i> , 1993)	44
Figura 9: Classificação atual das variantes de HPV 18. (Adaptado de BURK <i>et al.</i> , 2013)	45
Figura 10: Eletroferograma do sequenciamento de amostras positivas para o HPV 18. (Autoria própria)	57
Figura 11: Prevalência de tipos de HPV na população estudada. São Luís – Maranhão. 2016-2017	64
Figura 12: Distribuição das variantes de HPV 18 na população estudada (n = 12). São Luís – Maranhão. 2016-2017	64
Figura 13: Árvore filogenética do HPV 18 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). São Luís – Maranhão. 2016-2017	66
Figura 14: Tipos histológicos de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017	67
Figura 15: Distribuição dos tumores positivos para HPV 18 de acordo com o estadiamento (n = 12). São Luís – Maranhão. 2016-2017	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatística do câncer cervical e infecção por HPV em mulheres no mundo. (Adaptado de: BRUNI <i>et al.</i> , 2017)	19
Tabela 2: Representação do genoma viral do HPV 18 e variantes com linhagens e sublinhagens. (Adaptado de BURK; HARARI; CHEN; 2013)	46
Tabela 3: 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	61
Tabela 4: 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	62
Tabela 5: Distribuição dos pacientes conforme prática do exame preventivo e tabagismo. São Luís – Maranhão. 2016-2017	63
Tabela 6: Tipos histológicos de 12 mulheres com HPV 18. São Luís – Maranhão. 2016-2017	68
Tabela 7: Avaliação entre idade e tipos histológicos em relação as variantes de HPV 18 encontradas (n=12). São Luís – Maranhão. 2016-2017	68
Tabela 8: Distribuição de sublinhagens de HPV 18 de acordo com o tipo histológico (n=12). São Luís – Maranhão. 2016-2017	69
Tabela 9: Estadiamento tumoral de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Aspectos epidemiológicos do Câncer do Colo do Útero e HPV no mundo, no Brasil e no Maranhão	18
2.2. Abordagem ao histórico do HPV / Câncer do Colo do Útero	23
2.3. Manifestações clínicas do HPV e Câncer do Colo do Útero	25
2.4. Aspectos histológicos do Câncer do Colo do Útero	27
2.5. Estadiamento do Câncer do Colo do Útero	30
2.6. Rastreio de Lesões Precursoras do Câncer do Colo do Útero	31
2.7. Biologia do HPV	33
2.8. Classificação do HPV	36
2.9. Ciclo de Vida e Carcinogênese Mediada pelo HPV	39
2.10. Variações Intratipo de HPV	43
2.11. Variantes de HPV 18 e o Câncer do Colo do Útero.....	43
3. OBJETIVOS	48
3.1. Geral	48
3.2. Específico	48
4. METODOLOGIA	49
4.1. Tipo de Estudo	49
4.2. Período e Local do estudo	49
4.3. População e Amostra	49
4.3.1. Critério de inclusão	49
4.3.2. Critério de exclusão	50
4.4. Cálculo Amostral	50
4.5. Instrumento de coleta	51
4.6. Procedimentos experimentais	51
4.6.1. Extração do DNA	51
4.6.2. Quantificação de DNA e Nivel de Pureza	52
4.6.3. Detecção do DNA do HPV por PCR Nested	53
4.6.4. Visualização dos produtos amplificados	55

4.6.5. <i>Purificação de produtos de PCR</i>	55
4.6.6. <i>Sequenciamento Automatizado</i>	55
4.6.7. <i>Identificação das variantes de HPV 18</i>	58
4.7. Análise estatística	59
4.8. Análise por Filogenia	59
4.9. Aspectos Éticos	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Aspectos sociodemográficos e clínicos	60
5.2. Identificação dos tipos de HPV	63
5.3. As variantes do HPV 18	64
5.4. Tipos histológicos dos tumores analisados	67
5.5. Estadiamento tumoral dos tumores cervicais analisados	70
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	96
Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	97
ANEXOS	99
Anexo A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	100
Anexo B: Questionário Sociodemográfico	104
Anexo C: Recibo do Artigo submetido no Journal of Medical Virology	115
Anexo D: Artigo submetido - Human papillomavirus type 18 variants and cytology aspects in cervical cancer: review	116
Anexo E: Normas da Revista Medical Virology para Submissão	131

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema global que vem crescendo ao longo dos anos. Ele se configura por uma proliferação anormal de células com capacidade para invadir e espalhar-se para outras partes do corpo (SIERRA *et al.*, 2016). Mais de cem tipos de câncer podem ser encontrados na população humana, sendo responsável pela morte de mais de 22,2 milhões pessoas no mundo até o ano de 2030, sendo a maioria dos casos ocorrendo em países em desenvolvimento (VINEIS; WILD, 2013; CROSSLEY; CROSSLEY, 2017).

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). No Brasil, ele é o terceiro tumor mais frequente nessa população, atrás do câncer de mama e do colorretal Instituto Nacional de Câncer (INCA,2017). De acordo com o INCA, para o biênio 2018-2019, o câncer do colo do útero permanece na terceira posição entre os tipos de câncer mais incidentes na população feminina brasileira, com uma estimativa de 16.370 novos casos.

O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator etiológico do câncer do colo uterino e também é o patógeno viral sexual mais comum (YIN *et al.*, 2017). Está associadO ao desenvolvimento de doenças que vão desde verrugas benignas até o câncer invasivo (DOORBAR *et al.*, 2016). A descoberta do HPV como causa necessária para o câncer do colo do útero tem levado a avanços na prevenção do câncer, que inclui o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o vírus HPV e a ampliação de programas de rastreio e controle do câncer (PIERCE CAMPBELL *et al.*, 2016; SOTO; SONG; MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2017). A maioria das infecções são assintomáticas, podendo ser eliminadas naturalmente pelo sistema imune (CHEN *et al.*, 2015).

A família *Papillomaviridae* possui mais de 170 genótipos identificados, mas apenas 12 desses (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) são reconhecidos como tipos de alto risco pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (STAMENKOVI *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017).

Diversos países estão avaliando a possibilidade de implementação do teste molecular de HPV para o rastreamento de câncer cervical, com base em evidências que indicam que este teste molecular oferece proteção melhorada contra o câncer cervical invasivo em comparação com a triagem citológica (SIMMS *et al.*, 2017).

O HPV 18 é o segundo tipo mais carcinogênico e representa, aproximadamente, 12% dos carcinomas de célula escamosa, bem como 37% dos adenocarcinomas do colo do útero em todo o mundo. (CHEN *et al.*, 2015). Ele foi descrito inicialmente em 1984 e está presente em 16% de casos de câncer do colo do útero mundialmente (CHEN *et al.*, 2016). Poucos estudos foram realizados no Brasil em relação ao estudo das variantes dos HPV 18. No Maranhão, este tipo de estudo nunca foi realizado.

O interesse neste campo está crescendo rapidamente, visto que é desconhecida a razão pela qual somente algumas lesões de cérvix uterina associadas a genótipos de alto risco progredem para o câncer invasivo. Evidências sugerem que as variantes de um mesmo tipo de HPV podem interferir biologicamente e etiologicamente no desenvolvimento do câncer (BERNARD; CALLEJA-MACIAS; DUNN, 2006; XI *et al.*, 2007). Além disso, o interesse também se deve as variações no prognóstico dos carcinomas em diferentes estágios da doença de acordo em relação a 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. (MUÑOZ *et al.*, 2003; BURK *et al.*, 2013; BRUNI *et al.*, 2017).

Os estudos sobre as variantes do HPV vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de compreender a associação das mesmas com aspectos patológicos e oncogênicos das lesões do colo do útero. Estes aspectos entre as diferentes variantes podem contribuir para as disparidades na incidência do câncer cervical.

Neste estudo avaliou-se a diversidade das variantes genéticas do HPV18 em mulheres com diagnóstico de câncer do colo do útero (CHEN *et al.*, 2015).

Esta pesquisa é pioneira no Maranhão e fornece abordagem para a classificação filogenética e o uso em estudos epidemiológicos da história natural e carcinogenicidade mundialmente.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Aspectos epidemiológicos do Câncer do Colo do Útero e HPV no mundo, no Brasil e no Maranhão

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

De acordo com Bruni *et al.*, (2017), atualmente cerca de 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.

Mundialmente, as taxas de infecção por HPV cervical em exames de citologia normal é de 4.1/100 mil habitantes, sendo 4.4/100 mil habitantes em países em desenvolvimento e 3.9/100 mil habitantes em países desenvolvidos. Em contrapartida, a prevalência destes tipos para o câncer cervical aumenta para 69.4 no mundo, sendo 69.5 em países desenvolvidos e 71.8 para países em desenvolvimento. (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística do câncer do colo do útero e infecção por HPV em mulheres no mundo. (Adaptado de: BRUNI *et al.*, 2017).

População	Mundo	Regiões menos desenvolvidas	Regiões mais desenvolvidas
Mulheres (>=15 anos) em risco para câncer cervical em milhões	2,784.90	2,240.40	544.4
Taxas de câncer cervical			
Número anual de novos casos de câncer cervical	527,624	444,546	83,078
Incidência padrão para novos casos por 100.000	14	15.7	9.9
Número anual de mortes por câncer cervical	265.672	230.158	35.514
Taxa de mortalidade padrão por 100.000	6.8	8.3	3.3
Taxas de infecção por HPV cervical			
Prevalência (%) do HPV 16 e/ou HPV 18 entre mulheres com:			
Citologia normal	4.1	4.4	3.9
Lesão cervical de baixo grau (LSIL/CIN1)	25.8	25.1	25.9
Lesão cervical de alto grau (HSIL/CIN2/CIN3/CIS)	51.9	48.7	54.1
Câncer cervical	69.4	69.5	71.8

Em uma meta-análise realizada por Clifford *et al.*, (2003) buscou-se identificar a prevalência do HPV através de estudos realizados na Ásia, Europa e África. Identificou-se que em amostras de câncer cervical invasivo, os tipos mais prevalentes de HPV foram: HPV16, 18, 45, 31, 33, 58, 52, 35, 59, 56, 6, 51, 68, 39, 82, 73, 66 e 70. O HPV16 foi o tipo mais prevalente (46/63%), seguido pelo HPV18 (10/14%), 45 (2/8%), 31 (2/7%) e 33 (3/5%) em todas as regiões analisadas exceto Ásia, onde o HPV 58 (6%) e 52 (4%) foram mais frequentemente identificados.

Muñoz *et al.*, (2003), em um estudo sobre epidemiologia e classificação do HPV associado ao câncer cervical avaliou 11 estudos de caso-controle de 9 países envolvendo mulheres diagnosticadas com câncer do colo do útero. Foram analisadas populações de alto risco na África (Marrocos e Mali), América do Sul (Colômbia, Brasil, Paraguai e Peru), de risco intermediário na Ásia (Tailândia e Filipinas) e de populações de baixo risco (Espanha). O HPV foi detectado em 90.7%

das mulheres com câncer cervical, em comparação com 13.4% no grupo controle. Os tipos de HPV mais comuns entre os casos foram: HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35. Para o grupo controle foram encontrados em maior prevalência os tipos: HPV 16, 18, 45, 31, 6, 58, 35 e 33.

Em estudos da União Europeia, realizados por Wentzensen *et al.*, (2016), os tipos de alto risco oncogênico, principalmente o 16 e 18, são considerados os agentes etiológicos primários para o câncer cervical e lesões pré-cancerosas em mulheres. Eles também estão associados a lesões precursoras e carcinomas de células escamosas no trato anogenital de homens (VYAS *et al.*, 2016).

Os estudos de Ogilvie *et al.*, (2017) realizados no Canadá estimaram que o número de mulheres desenvolvendo câncer do colo do útero anualmente no mundo será de 700 mil até o ano de 2030, portanto a ampliação de investigações acerca do HPV e sublinhagens podem trazer novos conhecimentos científicos para auxiliar na diminuição das taxas de HPV e câncer cervical. Considerando a aprovação da vacina 9-valente do Papilomavírus Humano (HPV), houve um avanço no sentido da eliminação do câncer do colo do útero (BOSCH *et al.*, 2016).

Estudos indicam elevadas taxas de incidência e mortalidade em países em desenvolvimento. A maioria dos casos de câncer cervical ocorre na África, América Latina e Ásia, onde para cada 9 casos de câncer, pelo menos 1 é do câncer do colo do útero (VACCARELLA *et al.*, 2017). Menos de 50% das mulheres afetadas pelo câncer cervical em países subdesenvolvidos conseguem sobreviver por mais de 5 anos em comparação com 66% em países desenvolvidos (SIERRA *et al.*, 2016). Na China, a prevalência do HPV varia de 15% a 20,8% e a taxa de mortalidade por câncer do colo do útero chega a 4,1% ao ano (MO *et al.*, 2017).

Devido ao elevado custo e a ausência de infraestrutura necessária, programas de controle e rastreamento ainda não foram efetivamente implementados nessas regiões e, conseqüentemente, contribuem para o aumento das taxas de incidência e mortalidade (ARANDA *et al.*, 2017).

Em países desenvolvidos, como os da América do Norte, partes da Europa e Japão, os casos de câncer cervical são raros, com incidência inferior a 9 a cada 100 mil habitantes (RUDOLPH *et al.*, 2016). Este fato é justificado por estes países possuírem eficientes programas de rastreamento da doença que permitem a detecção precoce e a conduta apropriada de lesões pré-malignas.

As taxas de incidência variam tanto entre regiões como entre países, chegando a 9,9/100 mil mulheres em regiões mais desenvolvidas até 15,7/100 mil mulheres em regiões menos desenvolvidas. Com relação às taxas de mortalidade, as taxas variam de 3,3/100 mil para 8,3/100 mil mulheres, respectivamente. A África Oriental (42,7/100 mil), Melanésia (33,3/100 mil), Sul (31,5/100 mil) e África do Norte (30,6/100 mil) constituem regiões de maior risco, com taxas elevadas de incidência. Austrália/Nova Zelândia (5,5/100 mil) e a Ásia Ocidental (4,4/100 mil) estão entre as regiões que possuem as menores taxas de incidências do câncer do colo do útero. Já em relação a mortalidade, uma variação maior é observada entre estas regiões, sendo 2/100 mil mulheres na Ásia Ocidental, Europa Ocidental e Austrália/Nova Zelândia, enquanto que na Malásia, África Central e África Oriental pode chegar a mais de 20/100 mil mulheres (FERLAY *et al.*, 2015). Em 2015, no Brasil, ocorreram 5.727 óbitos por câncer do colo do útero (BRASIL, 2017).

Segundo as novas estimativas do INCA, para o biênio 2018-2019 são estimados 16.370 casos novos de câncer do colo do útero no Brasil 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 quarto tipo mais comum na população feminina no ranking mundial (INCA, 2017). (Figura 1).


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

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo feminino no Brasil, exceto pele não melanoma. (Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil), (Adaptado de: INCA, 2017).

Entre as regiões brasileiras, observa-se grande diferença entre as taxas de incidência do câncer do colo do útero. 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).

No Brasil, em um estudo realizado por Nogueira Dias Genta *et al.*, (2017) com mulheres diagnosticadas com câncer cervical invasivo em São Paulo, constatou-se a presença do HPV em 84% dos pacientes. Os tipos mais prevalentes foram: HPV16 (64%), HPV18 (10%), HPV33-58 (7%), HPV45 (5%), HPV31 (4%) e outros tipos de alto risco (11%).

No Maranhão, um estudo recente realizado por Nascimento *et al.*, (2018) buscou identificar a prevalência da infecção por HPV em comunidade quilombolas com diferentes achados citológicos. Identificou-se uma prevalência de 12,6% (50/395) entre as mulheres analisadas. Além disso, a maior prevalência do HPV foi obtida entre mulheres com diagnóstico de lesões intra-epiteliais de alto grau (42,0%). Identificou-se também 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).

Na capital São Luís, conforme o INCA (2015) foi estimado 230 casos novos desta patologia entre os anos 2016-2017. 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. Abordagem ao histórico do HPV / Câncer do Colo do Útero

Desde a Antiguidade tem-se o registro do aparecimento de verrugas na pele e na região genital, chamadas de condiloma acuminado (do grego *kondilus* = condilo; do latim *acuminare* = pontudo). Médicos gregos e romanos foram os primeiros a identificar a presença dessas verrugas, mas sua causa permanecia desconhecida (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).

Estudos foram realizados utilizando filtrado livre de células de verrugas de coelhos selvagens e inoculou-os em coelhos domésticos saudáveis, levando ao desenvolvimento das verrugas (ZUR HAUSEN, 1989). Posteriormente, em 1933, o desenvolvimento da microscopia eletrônica e do cultivo de células possibilitou a visualização e identificação do Papilomavírus como agente etiológico das verrugas (ZUR HAUSEN, 1989).

Em 1965 os primeiros experimentos que buscaram identificar a estrutura genômica do HPV começaram a ser realizados e, posteriormente, concluíram que se tratava de um DNA circular de dupla fita (ZUR HAUSEN, 1999).

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).

Experimentos visando estabelecer a relação entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical vem sendo realizados desde 1972, baseados em registros médicos

de que verrugas genitais benignas poderiam progredir para carcinomas de células escamosas invasivas. Estudos experimentais realizados por Zur Hausen (2009), permitiram o isolamento e caracterização do HPV 11 a partir de verrugas genitais e, posteriormente, em papilomas de laringe. Em seguida, novos experimentos permitiram a identificação do vírus em tumores humanos, permitindo o isolamento do HPV 16 a partir de biópsias de tumores cervicais e, posteriormente, a caracterização do HPV 18 em linhagens celulares derivados de tumores do colo uterino (ZUR HAUSEN, 2000).

Um dos primeiros estudos a explorar a diversidade genômica dos tipos de HPV foi realizado em 1993, onde analisou-se variações presentes no HPV 16 de acordo com sua distribuição geográfica (HO *et al.*, 1993). Foram realizados experimentos através de técnicas de hibridização por Southern Blotting ou digestão por enzimas de restrição para reconhecer possíveis variantes virais (DE VILLIERS *et al.*, 2004; BURK; HARARI; CHEN, 2013).

Posteriormente, com o desenvolvimento de novas técnicas moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do DNA viral, outros estudos forneceram evidências de que variações intratipos de HPV 16 e 18 influenciavam na heterogeneidade das neoplasias cervicais (DE VILLIERS *et al.*, 2004; ARIAS-PULIDO *et al.*, 2005; BERNARD; CALLEJA-MACIAS; DUNN, 2006; BURK *et al.*, 2013). A partir disto, muitos estudos visando explorar aspectos da biologia das variantes de HPV foram desenvolvidos, sendo a maioria deles realizados em HPVs do gênero alfafapilomavírus através da análise do genoma completo do vírus (BURK *et al.*, 2013).

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. Manifestações clínicas do HPV e Câncer do Colo do Útero

O câncer do colo uterino é caracterizada por um desenvolvimento lento, podendo apresentar sintomas na fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual (RODRIGUES *et al.*, 2016). É uma doença crônica que evolui a partir de uma lesão pré-maligna não invasiva que pode adquirir potencial invasor em um período de 5 a 6 anos (MEZEI *et al.*, 2017).

O HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum em todo mundo. Apresenta tropismo para células epiteliais, infectando células da pele e da mucosa genital e oral, através do contato direto com micro lesões (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 (Figura 2) (ARENDS; BUCKLEY; WELLS, 1998).

Estudos de história natural demonstraram que o risco de pré-câncer e câncer varia substancialmente para diferentes tipos de HPV carcinogênicos, sendo que o HPV16 está associado com o maior risco de câncer e pré-câncer (SCHIFFMAN *et al.*, 2011). HPV18 é o segundo tipo mais importante associado ao câncer, mas é menos prevalente em pré-cânceres. Vários tipos competem pelos próximos papéis mais importantes, com alguma variação geográfica (DE SANJOSE *et al.*, 2010). HPV18 e HPV45 são considerados particularmente importantes devido à sua associação com adenocarcinoma cervical.

A literatura mostra que a infecção pelo HPV é 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 (ISTs) (VEO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016). Os fatores associados a progressão ou infecção por HPV incluem: infecção única ou múltipla, subtipos encontrados e carga viral no epitélio infectado (Figura 2) (CAO *et al.*, 2016; GRABOWSKI *et al.*, 2016).

A compreensão de que o HPV é uma causa necessária do câncer do colo do útero levou a grandes avanços na prevenção primária e secundária do mesmo (WENTZENSEN, 2016).

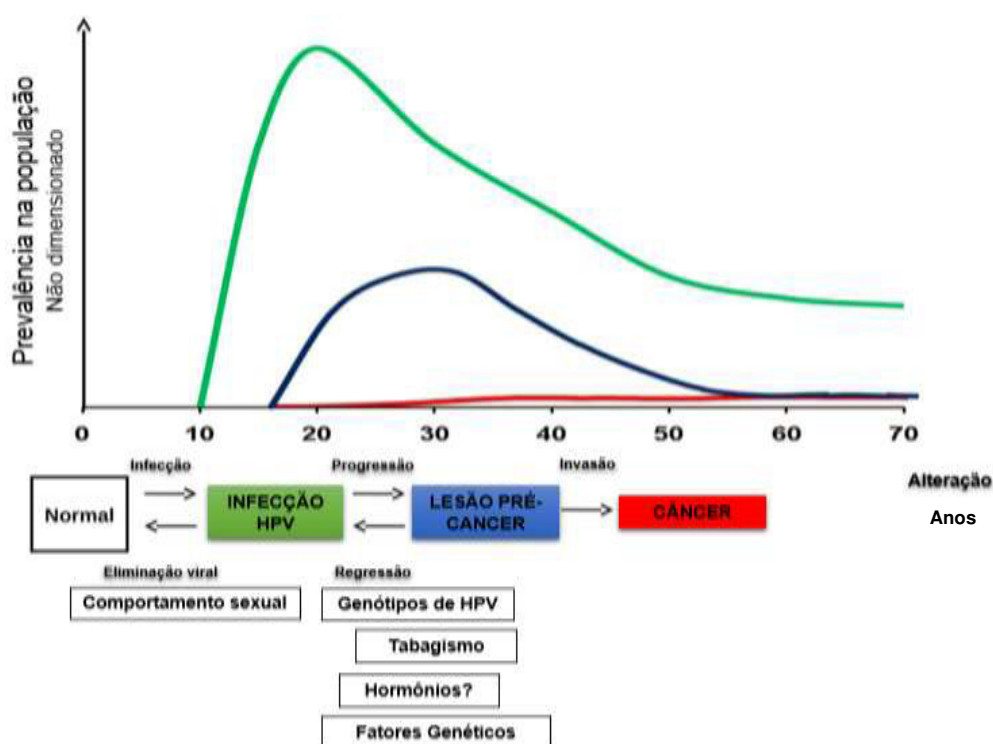


Figura 2: Modelo de progressão do carcinoma cervical e fatores de risco (Adaptado de: WENTZENSEN, 2016).

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 3). 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.

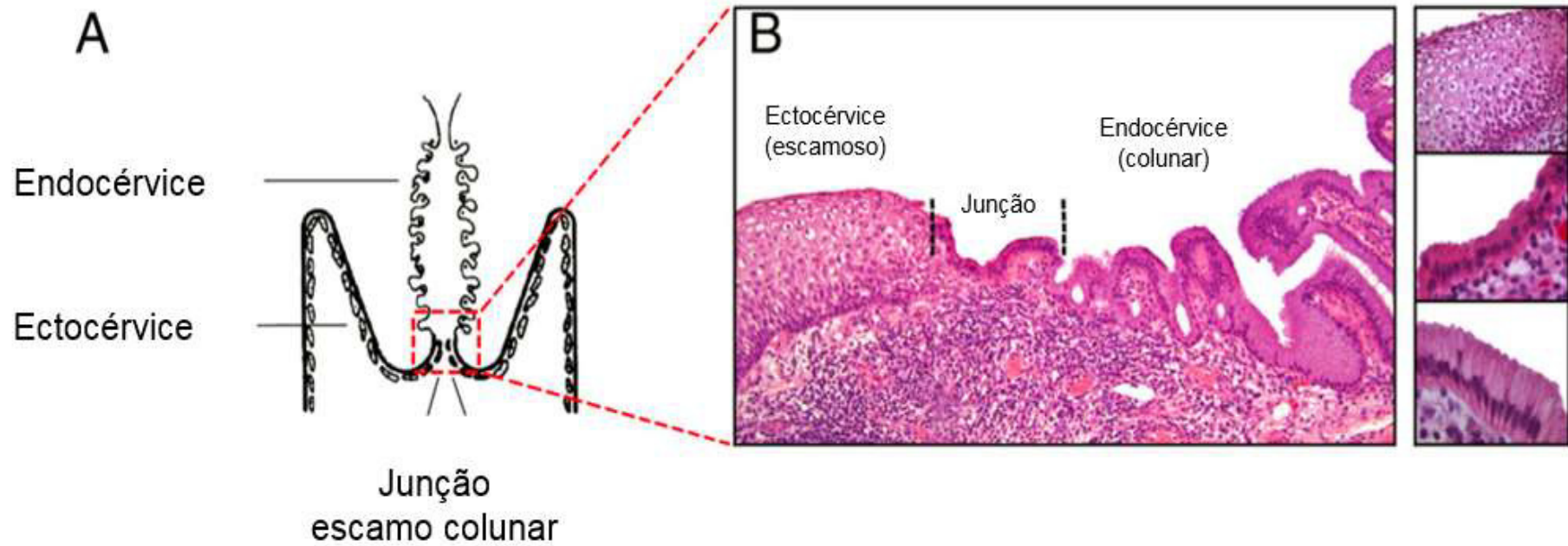


Figura 3: (A) Representação esquemática do colo uterino humano. (B) Corte histológico do colo. (Adaptado de: HERFS *et al*, 2012).

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 (DIZ; MEDEIROS, 2009; 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

O estadiamento consiste em um procedimento utilizado para identificar o grau de extensão do câncer, conforme TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) ou pelo sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (AJCC, 2004); União para o Controle Internacional do Câncer (UICC). A relevância baseia-se em fornecer informações aos profissionais da saúde para determinar o tratamento adequado e a 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 uterino; 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).

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) (WITTEKIND; ASSAMURA; SOBIN, 2014). (Figura 4).

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

O melhoramento do estadiamento, tem sido alternativa como o emprego de métodos de imagem – tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (RM) e *positron emission tomography* (PET). Os métodos de imagem demonstram elevada acurácia para avaliação do tamanho do tumor, detecção do envolvimento do paramétrio e vagina, e de gânglios com volume aumentado (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Contudo, 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 de Lesões Precursoras do Câncer do Colo do Útero

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda para a prevenção do câncer do colo do útero, a realização do exame de Papanicolau no período de três em três anos, após dois exames anuais consecutivos negativos. 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).

No Brasil este exame é realizado de forma não padronizada e, conseqüentemente, metade dos diagnósticos positivos são detectados em estágios avançados, mantendo as altas taxas de mortalidade (GASPERIN; BOING; KUPEK, 2011). 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).

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 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, o Instituto Nacional do Câncer Americano na cidade de Bethesda (Maryland, EUA) criou uma nova 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. Biologia do HPV

O HPV é um pequeno vírus não envelopado pertencente à família *Papillomaviridae*, possui estrutura e organização do genoma altamente conservado (TJALMA *et al.*, 2005; ZUR HAUSEN, 2009). Ele apresenta DNA circular de dupla fita de até 8.000 pares de bases nucleotídicas, diâmetro de 55 nm e capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros composto por duas proteínas estruturais L1 e L2 (BURD, 2003; PINIDIS *et al.*, 2016).

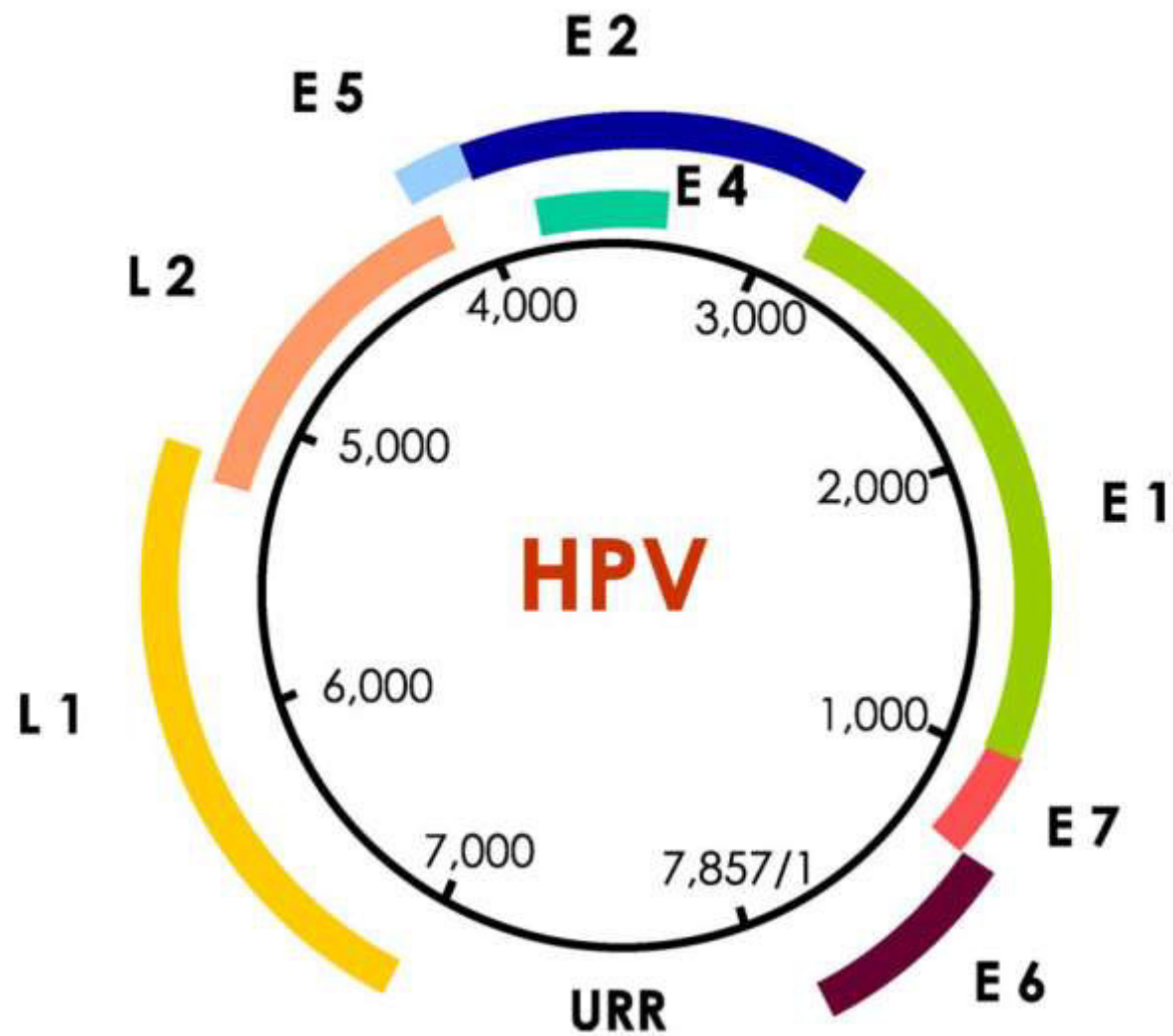


Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV. (Adaptado de: MUÑOZ *et al.*, 2006).

O genoma é formado por uma região aberta de leitura (do inglês, *Open Reading Frames* ou ORF), onde estão localizados os genes codificantes de proteínas; e uma região longa controladora (do inglês, *Long Control Region* ou LCR), não-codificante e responsável por controlar a replicação viral (MUÑOZ *et al.*, 2006; ZUR HAUSEN, 2009; PINIDIS *et al.*, 2016).

As ORFs podem ser classificadas em 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 está localizada entre a extremidade de L1 e o início da região de expressão precoce (região E) e possui regiões promotoras, sítios de ligação de fatores de transcrição e a região de origem de replicação do vírus (Figura 5) (FELLER *et al.*, 2009; BIRYUKOV; MEYERS, 2015; SCHIFFMAN *et al.*, 2016).

As proteínas do HPV recebem o mesmo nome de seus genes: proteínas não-estruturais E (E1-E7), e proteínas estruturais L (L1 e L2). 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).

Estudos indicam que 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).

Apesar da grande quantidade de vírus HPV identificados, todos os Papilomavírus apresentam genes principais envolvidos na replicação e formação do vírions durante a infecção viral (RIVOIRE *et al.*, 2001; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, *et al.*, 2012).

2.8. Classificação do HPV

Os Papilomavírus são espécie-específicos e apresentam tropismo pelo epitélio escamoso da pele e das mucosas (HARDEN *et al.*, 2017). Além disso, os diversos tipos que infectam uma determinada espécie mostram uma tendência a se instalar em regiões preferenciais do organismo, sendo mais de 40 deles capazes de infectar o trato genital de homens e mulheres (DOORBAR *et al.*, 2016; SCHIFFMAN *et al.*, 2016; CROSSLEY; CROSSLEY, 2017).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) 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, mas raramente encontrados em lesões malignas (CHEAH; LOOI, 1998; GANGULY; PARIHAR, 2009; ZUR HAUSEN, 2009). Também são classificadas como de baixo risco oncogênico os tipos: 40, 42, 43 e 44. Infecções por HPVs de baixo risco são eventualmente eliminadas pelo sistema imune (ZUR HAUSEN, 1996). 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).

A família *Papillomaviridae* abrange 16 gêneros (humanos e animais) que, entre si, apresentam uma diferença maior que 40% na sequência de nucleotídeos em L1, que é a região genômica mais conservada entre os diferentes tipos virais. Entretanto, entre espécies há uma variação entre 30% e 40% na sequência de nucleotídeos (ALTEKRUSE *et al.*, 2003).

Os HPVs são agrupados em cinco gêneros principais e baseados em diferenças em suas sequências de DNA: alfapapilomavírus, betapapilomavírus, gamapapilomavírus, mupapilomavírus e nupapilomavírus, sendo os gêneros alfa e beta os mais representativos (Figura 6) (BURK *et al.*, 2013; BANSAL; SINGH; RAI, 2016). 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). Os HPVs considerados de alto risco pertencem ao gênero de alfapapilomavírus, sendo que os tipos mais prevalentes, HPV 16 e 18, pertence a espécie distintas: espécie 9 (HPV 16) e espécie 7 (HPV 18) (BURK *et al.*, 2013). A Figura 6 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.*, 2016).

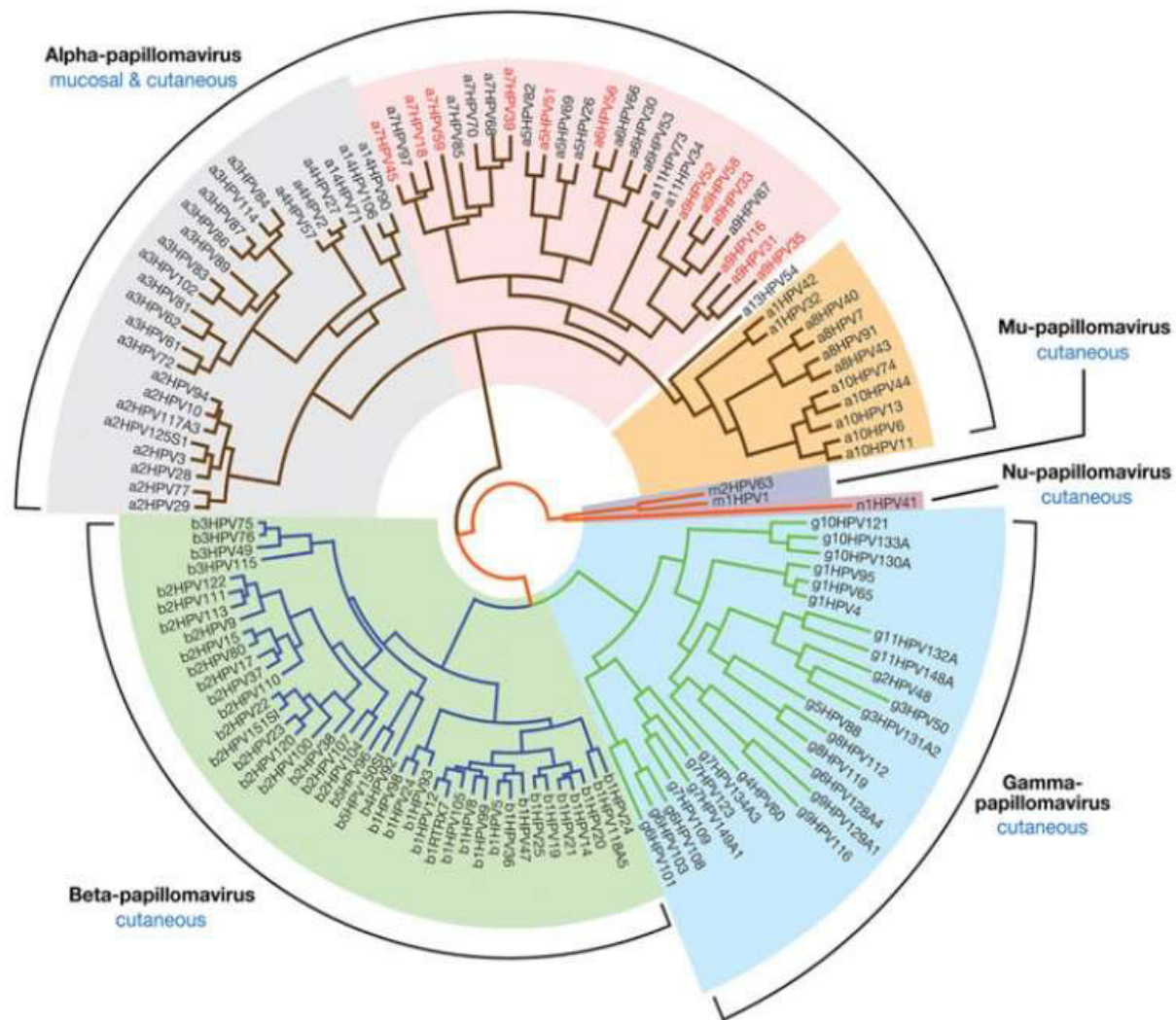


Figura 6: Árvore filogenética do HPV. (Adaptado de: MA *et al.*, 2014).

Ressalta-se, também, que os HPVs são agrupados de acordo com o seu tropismo tecidual por determinados tipos de epitélio e com a localização onde foram inicialmente isolados. Com base nessas características, destacam-se três grupos de HPV: cutâneos, mucosos e associados a Epidermodisplasia Verruciforme (EV). Dentre os tipos associados a infecções cutâneas estão os tipos 1, 4, 41 e 48; já os associados a infecções mucosas estão os tipos 6, 11, 16, 18, 33, 35, 53, 58 e 59. Os tipos 5,8, 9,12, 14,15, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 36, 38, 46, 50, 93 e 96 estão associados a epidermodisplasia verruciforme (LETO *et al.*, 2011).

2.9. Ciclo de Vida e Carcinogênese Mediada pelo HPV

O HPV infecta principalmente células epiteliais escamosas do trato genital e seu ciclo de vida está associado ao nível de diferenciação de células da camada basal do epitélio (HONG; LAIMINS, 2016). Em tecido estratificado normal, somente as células da camada basal possui capacidade de proliferação, sendo essa uma propriedade importante para a produção de vírions (WALHART, 2015; HONG; LAIMINS, 2016; LI *et al.*, 2016).

A infecção inicia-se quando o vírus alcança as células da camada basal da epiderme através de microlesões e, uma vez dentro da célula, o DNA viral é liberado do capsídeo e transportado até o núcleo para que seja replicado, levando a formação de várias cópias de seu DNA ou se mantendo na forma estável, episomal, garantindo uma infecção persistente (BIRYUKOV; MEYERS, 2015; WALHART, 2015; LI *et al.*, 2016). Ao alcançar os queratinócitos diferenciados da camada suprabasal, inicia-se a fase proliferativa e a síntese proteica do vírus. Inicialmente, os genes E1 e E2 passam a ser expressos e regulam a expressão de outros genes precoces e a produção de vírions (ZUR HAUSEN, 2000; FELLER *et al.*, 2009). Depois da divisão dessas células, E2 regula a distribuição do DNA viral para as células filhas. Após a maturação de células suprabasais, o ciclo do HPV passa a expressar os genes E6 e E7 (Figura 7) (GANGULY; PARIHAR, 2009; HONG; LAIMINS, 2016).

A proteína E6 impede que a célula entre em apoptose (que geralmente ocorre em resposta a uma infecção viral) e a proteína E7 ativa mecanismos de replicação

celular, ativando a fase S do ciclo e deixando a maquinaria celular disponível para a replicação do DNA viral (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; PINIDIS *et al.*, 2016). Eventualmente, L1 e L2 são produzidos e levam a formação do capsídeo e formação do vírus e, posteriormente, conseguem escapar das células epiteliais (FELLER *et al.*, 2009; ZUR HAUSEN, 2009).

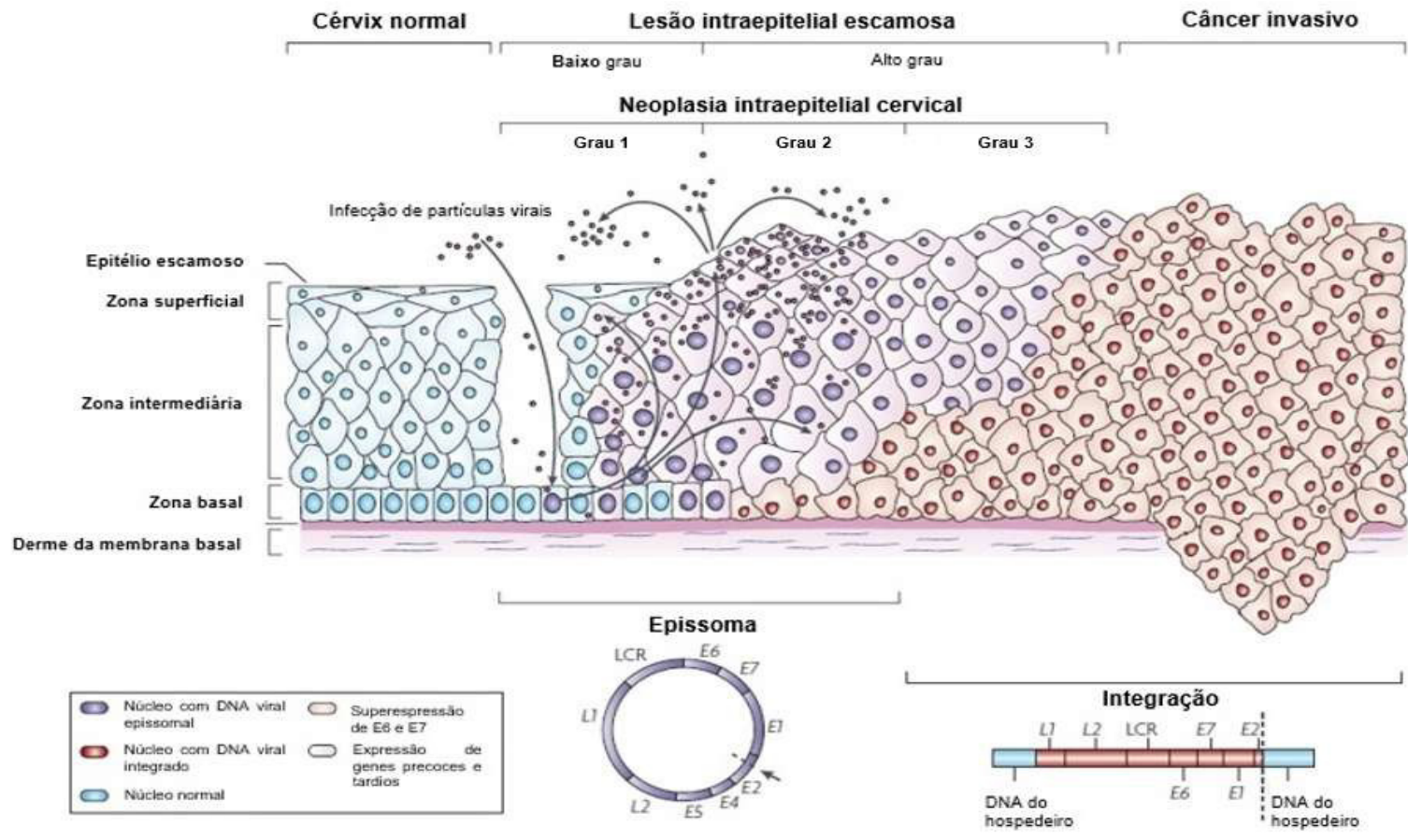


Figura 7: Esquema representativo do mecanismo de infecção do HPV no epitélio cervical. (Adaptado de: DOORBAR, 2006).

O mecanismo pelo qual o HPV leva a transformação maligna está associado a integração dos oncogenes virais E6 e E7, que são transcritos ativamente em células infectadas por HPVs de alto risco, sendo capazes de estimular o crescimento celular e levar a imortalização das células infectadas (ARENDS; BUCKLEY; WELLS, 1998; DOORBAR *et al.*, 2016; GRIFFIN; DOORBAR, 2016). (Figura 7).

A proteína produzida por E6 age diretamente sobre a proteína supressora de tumor p53. Esta é uma proteína que atua regulando negativamente o ciclo celular e sua ausência pode levar a proliferação anormal da célula (DOORBAR, 2006; FELLER *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2016). Quando a célula passa por algum dano, a proteína p53 é capaz de ativar o processo de apoptose e impedir a replicação de células defeituosas (FELLER *et al.*, 2009; ZUR HAUSEN, 2009). Na presença do vírus HPV, a proteína E6 se liga a proteína E6AP e forma um complexo ubiquitina-quinase, que leva a ubiquitinação de p53 e sua posterior degradação por um complexo proteassômico (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; DOORBAR *et al.*, 2016). Com a degradação de p53, eventos deletérios causados pelo vírus ocorrem dentro da célula, mas mesmo assim elas conseguirão sobreviver e acumular mutações em uma taxa maior do que o normal, contribuindo assim para a imortalização destas células infectadas (ZUR HAUSEN, 2000; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, *et al.*, 2012).

Já a proteína E7 atua na desregulação do ciclo celular através de sua ligação com a proteína retinoblastoma (pRB), induzindo a célula a sair da fase G0 para as fases G1 e S (PINIDIS *et al.*, 2016; ANACKER; MOODY, 2017). Normalmente, a pRB encontra-se ligada a E2F, um fator de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, mas que se mantém inativo quando ligado a pRB (GANGULY; PARIHAR, 2009; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, *et al.*, 2012). Na presença do HPV, a proteína E7 leva a degradação de pRB e a liberação de E2F. Com isso, genes que estavam sendo reprimidos passam a ser expressos e ativam o ciclo destas células, gerando instabilidade do DNA e proliferação celular descontrolada, favorecendo o desenvolvimento do tumor (RIVOIRE *et al.*, 2001; SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; ZUR HAUSEN, 2009).

2.10. Variações Intratipo de HPV

Pesquisas relacionados a este tema tem demonstrado que, 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). 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).

Considerando-se os tipos de alto risco oncogênico, HPV 16 e 18, a prevalência das variantes oscila em diferentes regiões do mundo e sua nomenclatura foi realizada baseada em sua prevalência em diferentes populações (BURK; HARARI; CHEN, 2013). Posteriormente, foi desenvolvida uma nova nomenclatura para a padronização em uma classificação alfanumérica (BURK; HARARI; CHEN, 2013).

2.11. Variantes de HPV 18 e o Câncer do Colo do Útero

O HPV 18 é o segundo tipo viral mais comumente associado ao câncer do colo do útero. Entretanto, sua prevalência é muito menor que o HPV 16, limitando o conhecimento sobre a influência das variantes na carcinogênese mediada por este

tipo viral. Pesquisas ressaltam que a diversidade no potencial oncogênico das variantes do HPV 18 está associado a uma distribuição geográfica e racial e apresenta similaridade de distribuição com o HPV 16 (ARROYO *et al.*, 2012; SUN; LU; LIU, 2012).

Os primeiros estudos visando analisar variações entre sequências do HPV 18 foram baseados apenas nas regiões LCR e E2 do genoma viral (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009). Entretanto, novos estudos foram realizados e identificaram três linhagens filogenéticas baseadas no estudo do genoma completo do HPV 18, sendo elas: duas linhagens não-africanas (europeia - E e asiático-ameríndio - AA), e uma linhagem africana com duas sublinhagens (africana 1 - Afr1 e africana 2 - Afr2) (NICOLÁS-PARRAGA *et al.*, 2016). A Figura 8 ilustra a classificação histórica das variantes de HPV 18 (ONG *et al.*, 1993)

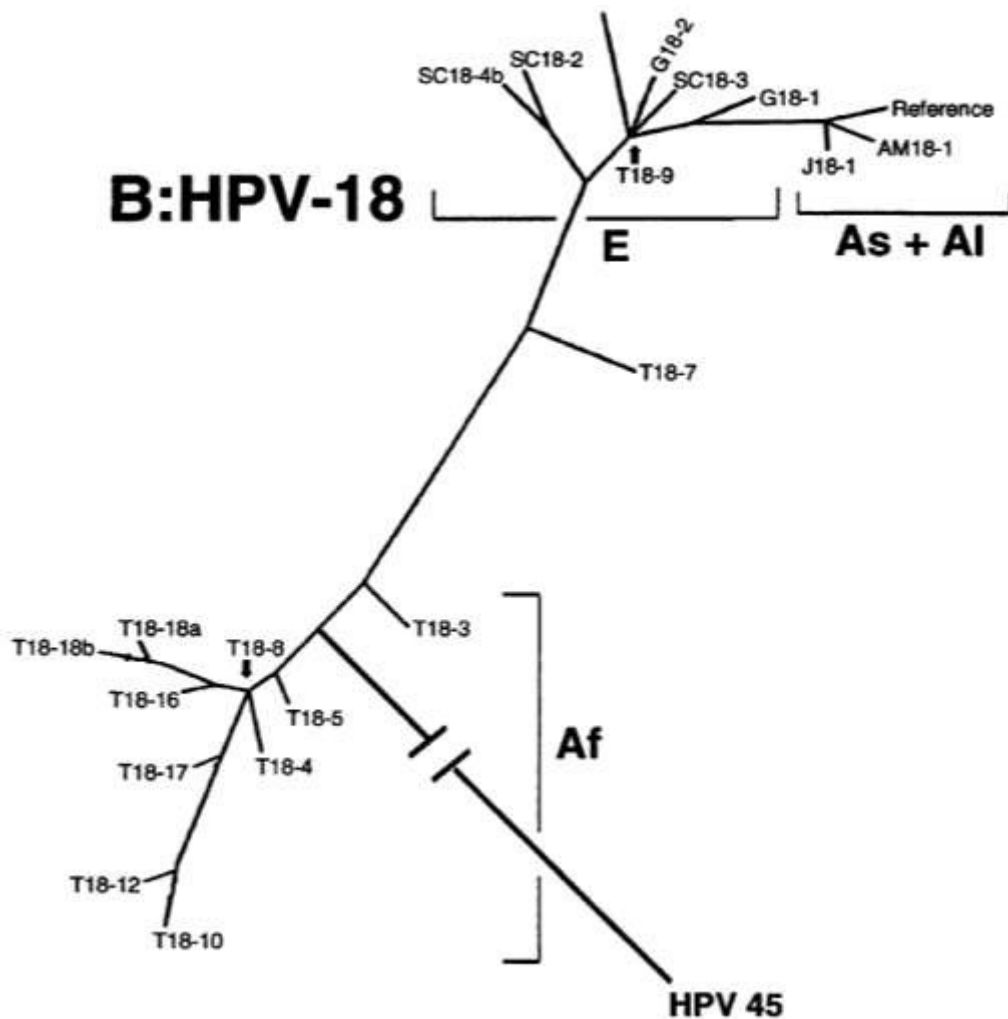


Figura 8: Classificação histórica das variantes de HPV 18. (Adaptado de: ONG *et al.*, 1993).

Entretanto, em uma nova classificação foram propostas três linhagens (AWUA *et al.*, 2017). A linhagem não-africana foi classificada por linhagem A com cinco sublinhagens, A1 a A5, a linhagem africana foi dividida em duas novas linhagens, sendo uma B com três sublinhagens, B1 a B3 e outra classificada como C (AWUA *et al.*, 2017). A Figura 9, ilustra a classificação atual das variantes de HPV 18 (BURK *et al.*, 2013).

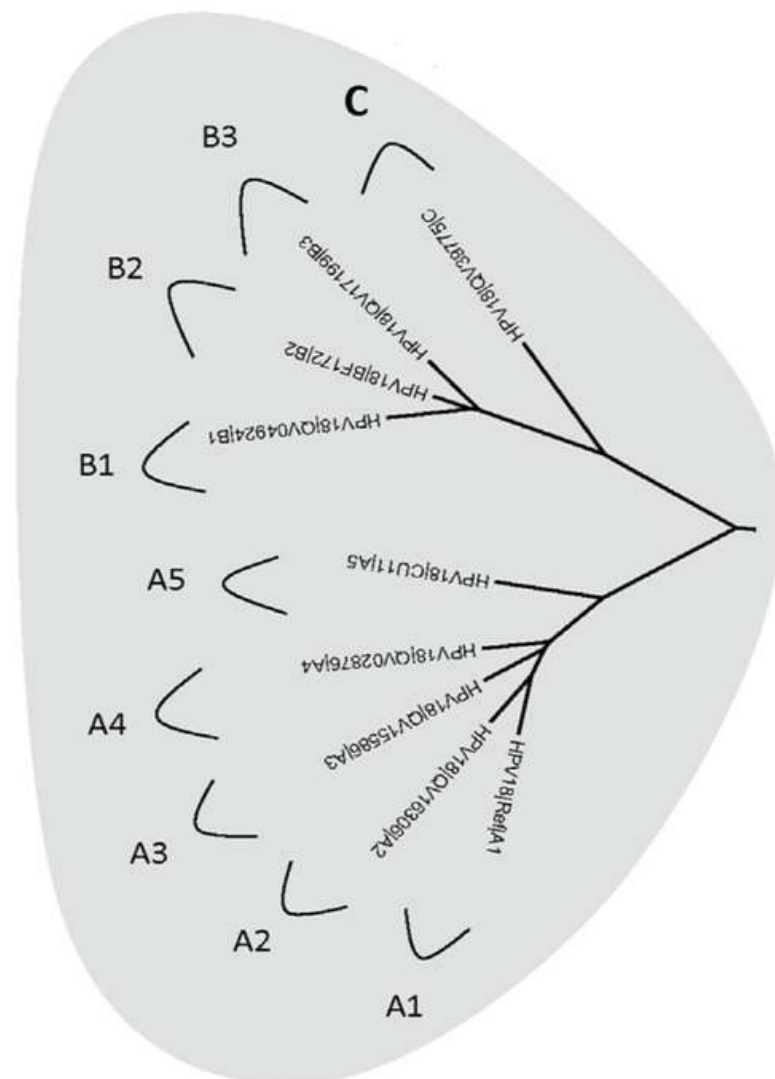


Figura 9: Classificação atual das variantes de HPV 18. (Adaptado de: BURK *et al.*, 2013).

Apesar da criação de nova nomenclatura, muitos estudos ainda utilizam a classificação antiga. Entretanto, a classificação nova pode ser traduzida para a nomenclatura histórica, sendo A1 e A2 = AA, A3 a A5 = E e B/C = AF. As diferenças entre linhagens são definidas entre 1,0% e entre as sublinhagens é de 0,5 a 0,9% (CHEN *et al.*, 2015; AWUA *et al.*, 2017).

Conforme o estudo de Xi *et al.*, (2006), a variante europeia persiste por mais tempo em mulheres caucasianas, enquanto a variante africana e asiático-americana persiste por mais tempo em mulheres afro-americanas. Em estudo de Arroyo *et al.*, (2012) realizado na Espanha, verificaram que das 56 amostras encontradas, 25 eram europeias (56,8%), 10 africanas (22,7%) e 5 asiático-americano (11,4%). Sun, Lu e Liu (2012), realizou um estudo na China com 65 amostra positiva para HPV 18 e verificaram que a variante mais comum foi AA (81,5%), seguida de E (18,5%) e nenhuma variação de AF foi encontrada. Segundo Burk, Harari e Chen; (2013) observa-se na Tabela 2 a representação do genoma viral do HPV 18 e variantes com linhagens e sublinhagens.

Tabela 2: Representação do genoma viral do HPV 18 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-7	HPV18	A	A1	Ref	AY262282	AsAi, AA, E1
			A2	Qv16306	EF202146	AsAi, AA, E1
			A3	Qv15586	EF202147	E, E2
			A4	Qv02876	EF202151	E, E2
			A5	CU11	GQ180787	E
		B	B1	Qv04924	EF202155	Af, Af1
			B2	BF172	KC470225	Af
			B3	Qv17199	EF202152	Af, Af2
		C	Qv39775	KC470229	Af	

Conforme a histologia tumoral, alguns estudos sugerem evidências de que o HPV 18 esteja associado ao desenvolvimento do adenocarcinoma em relação ao carcinoma de células escamosas (ARIAS-PULIDO *et al.*, 2005; SUN; LU; LIU, 2012). Além disso, outras pesquisas sugerem que a linhagem Asiático Americana é 4 vezes mais comum em adenocarcinoma quando comparados com a linhagem Europeia (BURD, 2003; DE BOER *et al.*, 2005).

Segundo Vidal *et al.*, (2016) por meio de estudos realizados no Rio de Janeiro, apontam aumento da frequência de variantes, tanto para HPV 16 quanto HPV 18, das linhagens mais prevalentes em populações Europeias e Norte Americanas, contudo, a diversidade genética de HPV 18 não evidenciou um padrão

de expansão de variantes específicas ou uma vantagem seletiva associada ao desenvolvimento de câncer cervical.

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.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Analisar as variantes intratipo de Papilomavírus Humano (HPV 18) em amostras de câncer do colo do útero em mulheres assistidas 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 DNA-HPV na população estudada;
- Identificar a frequência das variantes de HPV 18 e suas respectivas linhagens e sublinhagem;
- Relacionar o HPV 18 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 junho 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 e o material tumoral foi coletado a partir de biópsias de mulheres 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

Inicialmente, as pacientes encaminhadas para o 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, foram 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 (Anexo B).

Em seguida, a biópsia foi realizada e os fragmentos tumorais do colo do útero foram acondicionadas em microtubos, contendo 1 ml de RNA Later (Life Technologies) foram transportados em caixas térmicas a 4°C e enviadas ao Laboratório Multiusuário localizado no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão seguindo protocolos de cadastro e armazenamento. Após 24 horas, a amostra foi retirada do RNA later e armazenada em freezer a -80°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

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 bisturi 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 e Nível de Pureza

O DNA extraído foi quantificado através da leitura de absorvância 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, A260/A280, foi entre 1,6 e 1,9 o material foi considerado puro.

4.6.3. Detecção do DNA do HPV por PCR Nested

Para a identificação do DNA do HPV nas amostras de tumores do colo do útero, foi utilizada 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 round (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 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.

O primeiro round utiliza os *primers* PGMY 09 e 11 (Quadro 1), amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral; no segundo round são 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).

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	
PGMY11	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
PGMY09	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
GP+5/6	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 a 95°C por 4 minutos seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. 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, 0,3 µl de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) e água miliQ (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 5µL 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 µL de tampão de captura a 100 µL de produto de PCR. O material foi centrifugado e 2 µL 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 BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados, em cada reação, 2 µL do produto de PCR purificado, 40 ng dos

oligonucleotídeos específicos para o éxon utilizado (senso ou antisenso) e 2 µL de Big Dye.

Para a análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento foi utilizado o programa Chromas, obtendo-se eletroferogramas de sequências 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 10).

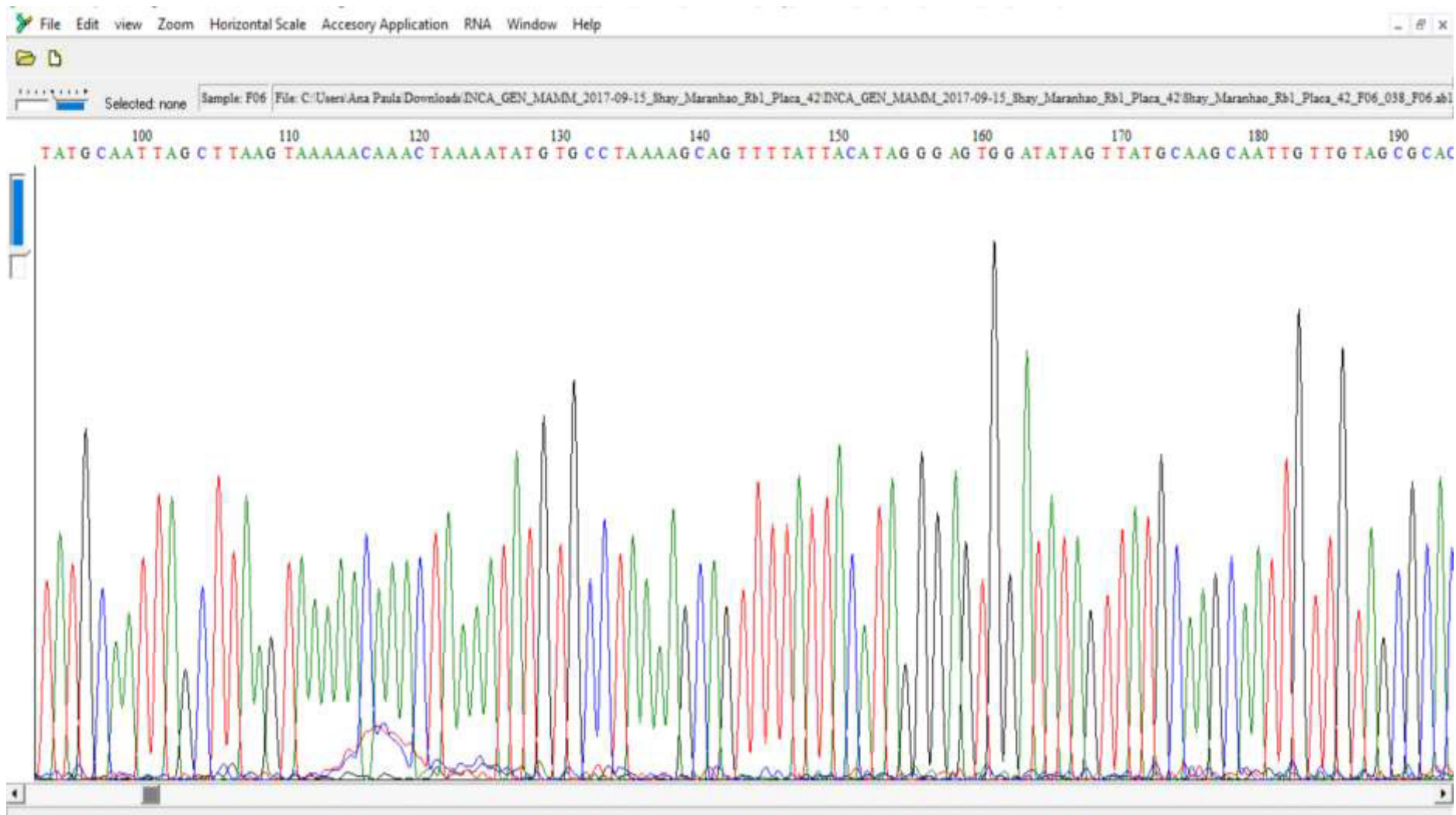


Figura 10: Eletroferograma do sequenciamento de amostras positivas para o HPV 18. (Autoria própria).

4.6.7. Identificação das variantes de HPV 18

Para a caracterização das linhagens de HPV 18, amostras positivas foram submetidas a PCR utilizando primers específicos para amplificação das regiões LCR e o gene E6 do vírus (Quadro 2). A reação consistiu de um volume final de 25µL, sendo 1X PCR Buffer, 2,5mM de MgCl₂, 0,25µM 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 18, utilizando sequências referência propostas por Burk *et al* (2013) utilizando o software MEGA (versão 6.0, 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.

Quadro 2: Primers utilizados para PCR para amplificação de sequências de LCR e E6 do HPV 18, temperatura de anelamento e posição nas sequencias genômicas de referências. (Adaptado de: VIDAL *et al.*, 2016)

Primer	Sequência 5' – 3'	T _m	Sequência de referência	Posição genoma
LCR F HPV 18	TCTAAACCTGCCAAGCGTGT	50°C	AY262282 HPV18	7095–7115
LCR R HPV 18	ATGTGATGCCCAACCTATTT			7825–7845
E6 F HPV 18	GTTGCCTTTGGCTTATGTCTG	56°C		7468–7488
E6 R HPV 18	TTGCCTTTAGGTCCATGCATAC			587–607

T_m = temperatura de anelamento dos primers.

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 foi utilizado o teste χ^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 18 foi realizada utilizando dados de sequências de 1300pb referentes as regiões de E6 e LCR através do método “neighbour joining” com distância 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 18 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. Aspectos sociodemográficos e clínicos

A população do estudo foi composta por 120 pacientes diagnosticadas com câncer do colo uterino atendidas em hospitais de referência em Oncologia do estado do Maranhão.

Dentre as 120 mulheres com diagnóstico do câncer do colo do útero constatou-se o HPV em 88 (88/120; 73,3%) mulheres, sendo 12/88 (13,6%) destas com a presença de HPV 18. A faixa etária destas compreendiam de ≤ 29 a ≥ 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 3).

Tabela 3: 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	Total n (%)	HPV Ausente		HPV Presente		p-valor
		n	%	n	%	
Idade (Anos)						
≤ 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	
Cor/Raça						
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	
Estado Civil						
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	
Renda Familiar						
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	
Escolaridade						
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	

Quanto aos fatores de risco para o 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 na 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 4).

Tabela 4: Características dos fatores de risco e história reprodutiva de pacientes com câncer do colo de útero e a relação com a presença do Papilomavírus Humano (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Fatores de Risco	HPV						p-valor
	Total		Ausente		Presente		
	n	%	n	%	n	%	
Idade do início da atividade sexual (Anos)							
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	
Idade da 1ª Gestação							
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	
Número de Gestações							
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	
Uso de Contraceptivo							
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	
Número de Parceiros Sexuais							
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 ao exame preventivo, a maioria das mulheres (84/70%) relataram ter realizado o exame Papanicolau 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 5).

Tabela 5: Distribuição dos pacientes conforme prática do exame preventivo e tabagismo. São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Fatores de Risco	HPV						p-valor
	Total		Ausente		Presente		
	n	%	n	%	n	%	
Realização do Exame Preventivo antes do diagnóstico							
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	
Frequência de realização do preventivo							
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	
Tabagismo							
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 18 foi o segundo tipo mais prevalente entre os casos analisados e, juntamente com o HPV 16, 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 11).

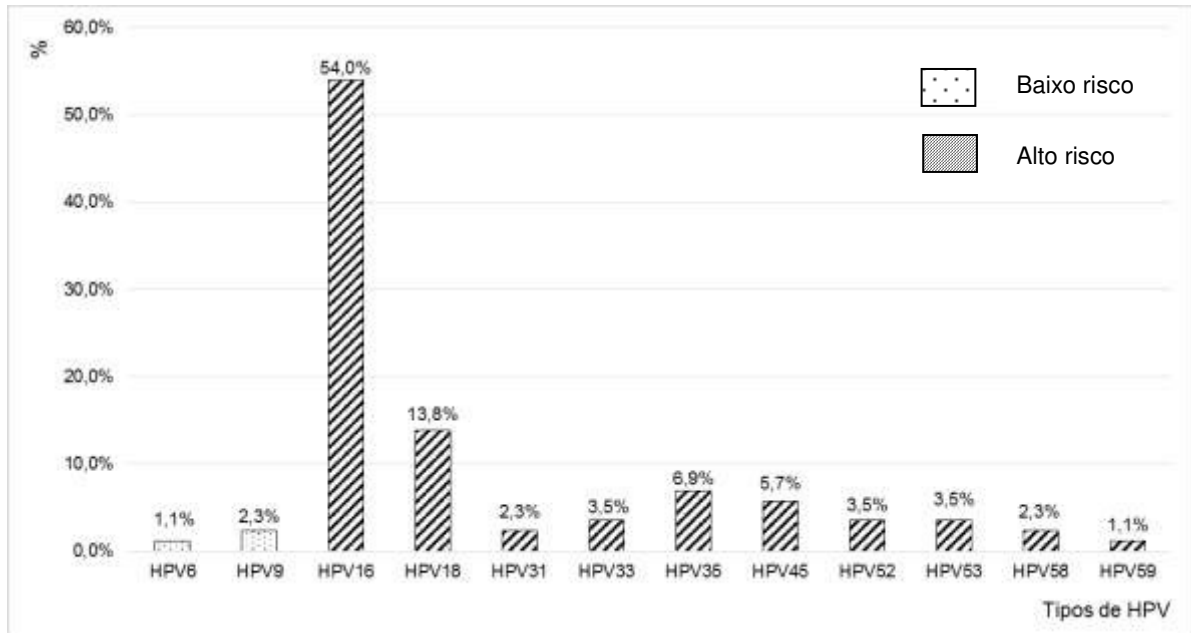


Figura 11: Prevalência de tipos de HPV na população estudada. São Luís – Maranhão. 2016-2017.

5.3. As variantes do HPV 18

A identificação das variantes de HPV 18, foram sequenciados a partir de produtos de PCR correspondentes às regiões E6 e LCR do genoma viral. Dentre as 12 amostras positivas para o HPV 18, 10 foram identificadas como variante A (80%) e 2 amostras foram identificadas como variante B (20%).

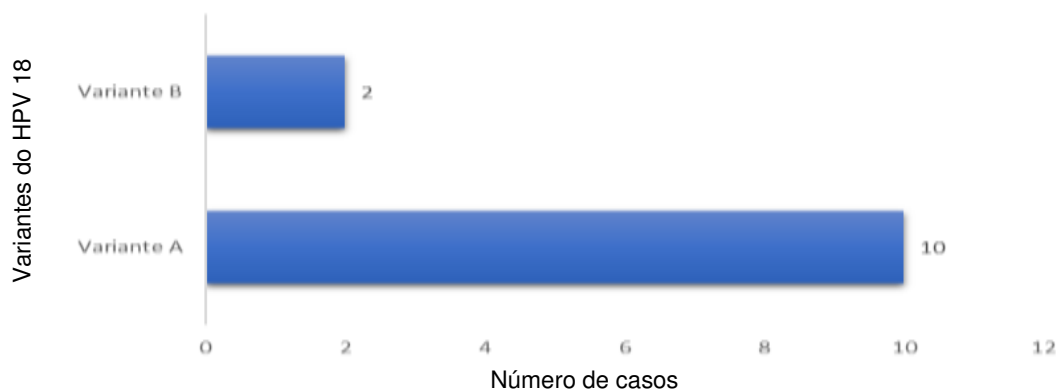


Figura 12: Distribuição das variantes de HPV 18 na população estudada (n = 12). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se sequência de referência descritas por Burk *et al.*, (2013). De acordo com a similaridade entre as sequências de amostras do HPV 18 e as sequências de referência, gerou-se dois agrupamentos distintos, correspondentes as linhagens A e B. A linhagem C não foi encontrada em nosso estudo. (Figura 13).

Dentre as amostras cervicais com HPV 18 classificadas como pertencentes a linhagem A, foram identificadas as sublinhagens A1, A2, A3 e A4. Já entre as pertencentes a linhagem B, identificou-se as sublinhagens B1 e B2.

Foram encontradas 3 pertencentes a sublinhagem A1, 1 pertencente a sublinhagem A2, 2 pertencentes a sublinhagem A3 e 2 pertencentes a sublinhagem A4. Em duas amostras pertencentes a linhagem A, não foi possível identificar a sublinhagem.

Dentre as amostras cervicais com HPV 18 classificadas como pertencentes a linhagem B, 1 pertencia a linhagem B1 e 1 pertencia a linhagem B2. (Figura 13).

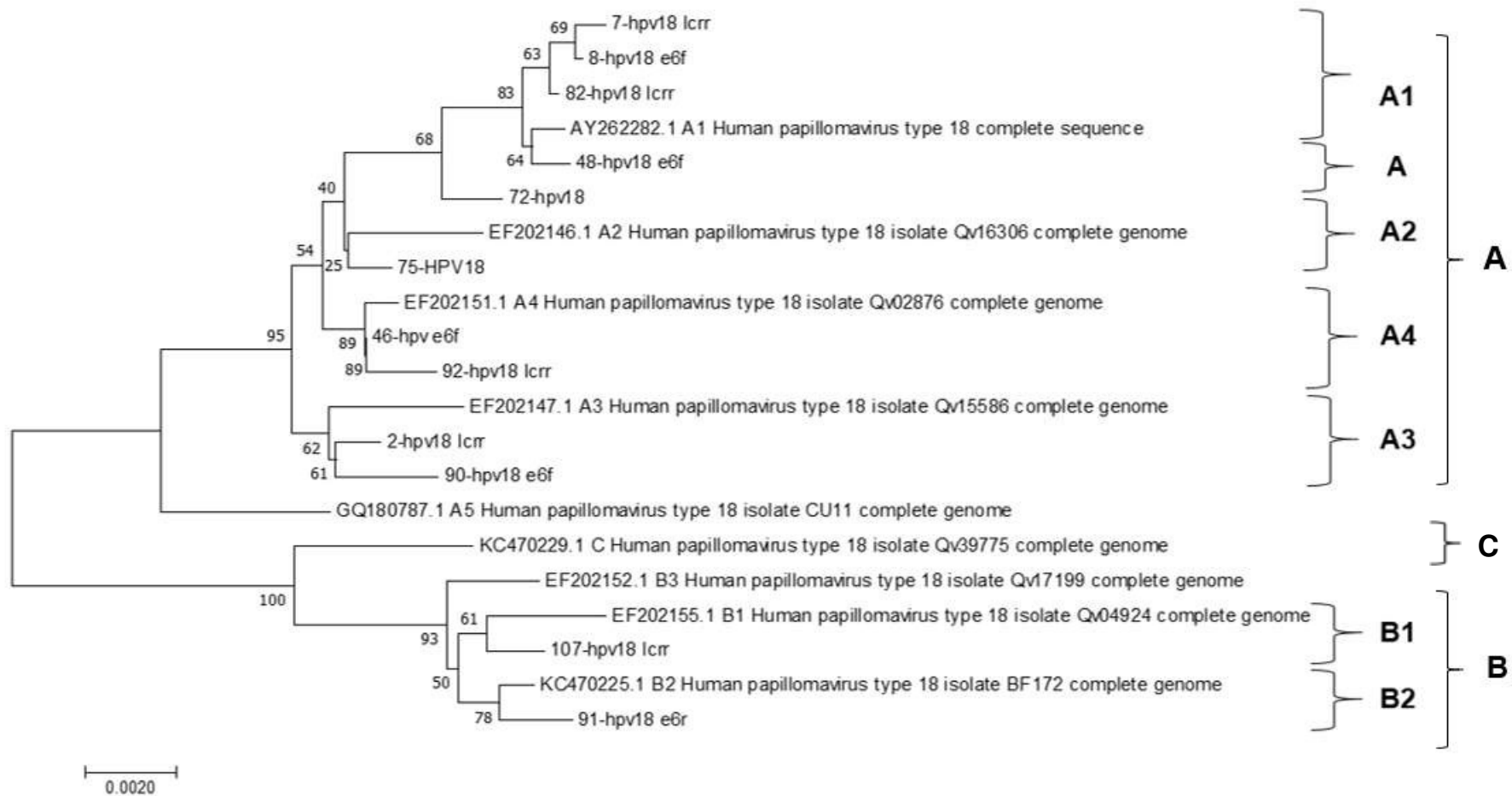


Figura 13: Árvore filogenética do HPV 18 com identificação de linhagens. O método utilizado foi Neighbour-Joining (para construção das filogenias) com distância “p” (obtidas com pairwise deletion), os números nos nós são valores de bootstrap (com 1000 réplicas). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

5.4. 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 14).

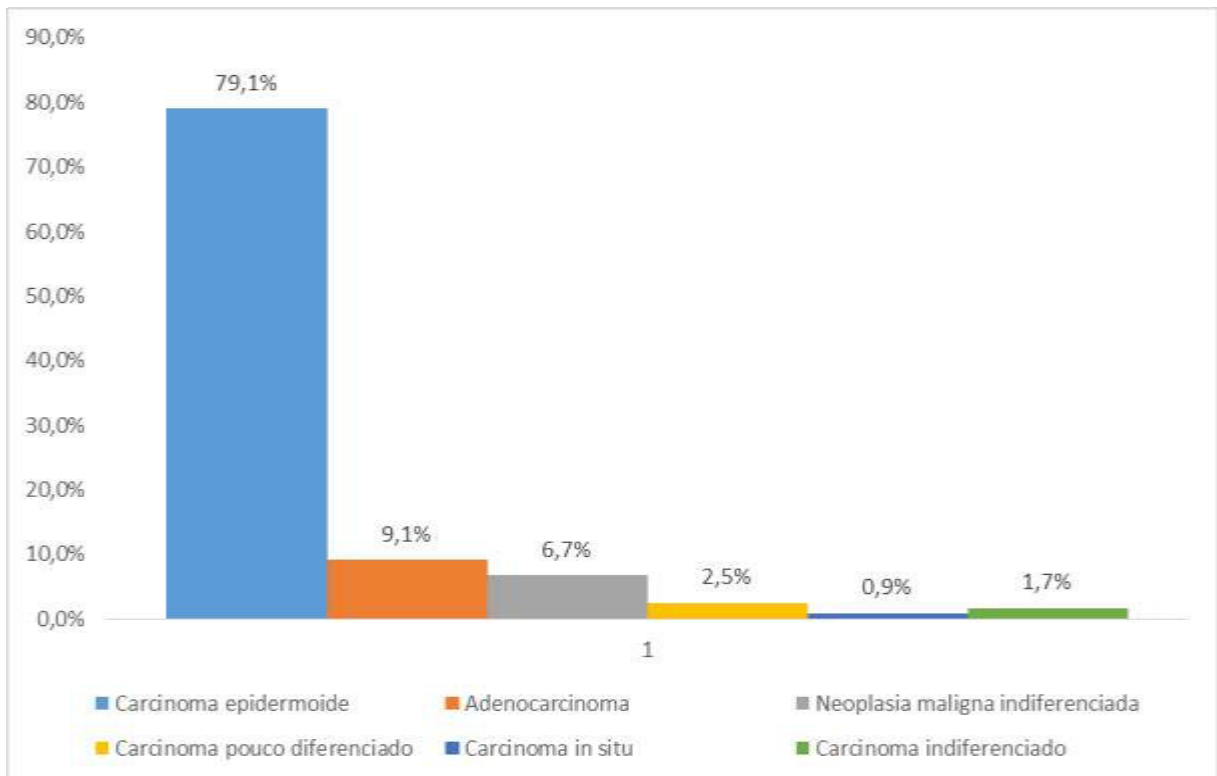


Figura 14: Tipos histológicos de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Para as pacientes com HPV 18, os tipos histológicos encontrados foram: carcinoma epidermoide (6/50.0%), adenocarcinoma (3/25.0%), neoplasia maligna indiferenciada (2/16.7%) e carcinoma indiferenciado (1/8.3%). (Tabela 6).

Tabela 6: Tipos histológicos de 12 mulheres com HPV 18. São Luís – Maranhão. 2016-2017.

TIPO HISTOLÓGICO	Nº	%
Carcinoma epidermoide	6	50,0
Adenocarcinoma	3	25,0
Neoplasia maligna indiferenciado	2	16,7
Carcinoma indiferenciado	1	8,3

As 12 mulheres com câncer de colo de útero e infectadas com HPV 18 tinham idade mínima de 28 e acima de 70 anos, com média etária de 53,4 anos (mediana = 51,0) para variante A. Contudo, analisando a variante B, verifica-se a média etária de 37 (mediana de 37 anos).

A análise quanto ao tipo histopatológico do tumor das 12 mulheres com HPV 18, identificou-se o carcinoma epidermoide (CE) mais frequente para variante A (41,7%), enquanto para aquelas com adenocarcinoma (ADC) foi de 25,0% da amostra e para o carcinoma indiferenciado foi de 8.35%. A variante B compreendeu 16,6%, sendo apenas uma mulher com carcinoma epidermoide (8.3%) e outra com neoplasia maligna indiferenciada (8.3%) (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação entre idade e tipos histológicos em relação as variantes de HPV 18 encontradas (n=12). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Características		Variantes de HPV 18	
		A (n = 10)	B (n = 2)
Idade	Média	53,4	37
	Mediana	51	37
Tipo de tumor	CE	5 (41.7%)	1 (8.3%)
	ADC	3 (25.0%)	-
	NMI	1 (8.35%)	1 (8.3%)
	CI	1 (8.35%)	-

Legenda: CE= carcinoma epidermoide, ADC= adenocarcinoma, NMI= neoplasia maligna indiferenciada, CI= carcinoma indiferenciado.

Em relação aos tipos histológicos nos tumores positivos para o HPV 18, identificou-se que dois casos de carcinoma epidermoide pertenciam a sublinhagem A3, dois pertenciam a sublinhagem A4, 1 pertencia a sublinhagem B2, e 1 identificou-se apenas como linhagem A (Tabela 8).

Já em relação ao adenocarcinoma, 1 caso pertencia a sublinhagem A2 e 1 não foi possível identificar a sublinhagem.

A média etária entre os pacientes com HPV 18 variou em relação ao tipo histológico do tumor, sendo 57.5 para os casos de carcinoma epidermoide, 42 para casos de adenocarcinoma e 41.5 para neoplasia maligna indiferenciada.

Tabela 8: Distribuição de sublinhagens de HPV 18 de acordo com o tipo histológico (n=12). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Sublinhagem	Carcinoma epidermoide	Adenocarcinoma	Neoplasia maligna indiferenciada	Carcinoma indiferenciado
Idade	57.5±14.9	42±5.5	41.5±19.09	54*
A	0	1	0	1
A1	1	1	1	0
A2	0	1	0	0
A3	2	0	0	0
A4	2	0	0	0
B1	1	0	0	0
B2	0	0	1	0
Total	6	3	2	1

*Para o carcinoma indiferenciado não tem como calcular média e desvio padrão, pois só possui uma amostra.

5.5. Estadiamento tumoral dos tumores cervicais analisados

Com relação ao estadiamento tumoral, das 120 mulheres do estudo, verificou-se que 45 mulheres (37.5%) apresentaram tumores em estadio IIIB, 31 mulheres (25.8%) apresentaram estadio IIB e 11 mulheres (9.2%) apresentavam estadio I. O estadio IVA esteve presente em 5 amostra (4.1%). (Tabela 9).

Tabela 9: Estadiamento tumoral de pacientes com câncer do colo do útero (n = 120). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

Estadiamento	n	(%)
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
TOTAL	120	100

Quanto a distribuição das mulheres com HPV 18 de acordo com o estadiamento, houve o predomínio do estadio IIB em 5 amostras, seguido pelo estadio I e IIIB em 2 amostras, subsequentemente. Também obteve-se o estadio IB, IIA e IVB em 1 amostra (Figura 15).

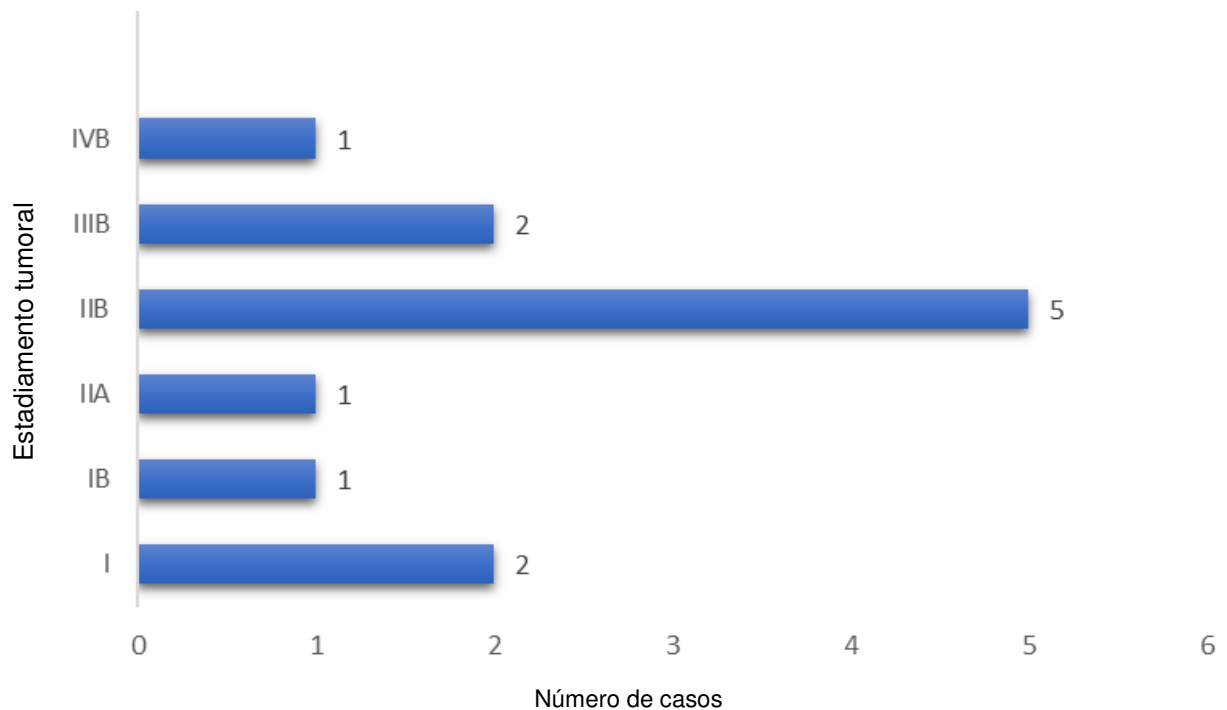


Figura 15: Distribuição dos tumores positivos para HPV 18 de acordo com o estadiamento (n = 12). São Luís – Maranhão. 2016-2017.

6. DISCUSSÃO

Na contextualização desta pesquisa sobre HPV, evidenciou-se que houve elevada prevalência do vírus (88/73.33%) em amostras tumorais do colo do útero. A prevalência do HPV em amostras de câncer cervical invasivo podem variar de 70% a 100% e estão associadas às diferentes técnicas utilizadas para a detecção viral (COUtlÉE *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2016). Mundialmente, o HPV 16 é o mais prevalente no câncer cervical, seguido pelo HPV 18. Contudo, a frequência entre os tipos de HPV podem variar de acordo com a região geográfica da população em análise. Investigações anteriores apontam que os quatro tipos de HPV mais prevalentes nas Américas do Sul e Central são o HPV 16, 18, 31 e 45 (WENTZENSEN *et al.*, 2016; SERRANO *et al.*, 2017).

Neste estudo, a maior frequência foi do HPV 16 (48/54.0%), seguido de 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.

Diversos estudos têm buscado associar as variantes intratipo de HPV16 e HPV18 com a persistência da infecção pelo vírus, o risco do desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical e 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. Assim sendo, a colonização das Américas por europeus e africanos é refletida na composição das variantes de HPV neste continente (HO *et al.*, 1993).

Neste estudo acerca do HPV 18, 12 amostras foram submetidas a análise para detecção de variantes. Dentre estas, 10 foram identificadas como pertencentes a variante A e 2 identificadas como pertencentes a variante B. A média de idade

entre as pacientes com HPV 18 foi de 53,4 para variante A e 37 anos para variante B, semelhante a dados obtidos em outros estudos.

Comparados com os estudos realizados com o HPV16, poucos estudos foram realizados descrevendo a frequência de linhagens em câncer cervical invasivo associado à infecção pelo HPV18. (CHEN *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018). Em relação as sublinhagens encontradas, para a variante A foram encontradas as sublinhagens A1, A2, A3 e A4. Já em relação a variante B, foram encontradas as sublinhagens B1 e B2.

Em estudo realizado por Xu *et al.* (2018) em 138 mulheres com diagnóstico de infecção pelo HPV 18 buscou-se identificar as variantes presentes na população de Taizhou, China. Concluiu-se que todas as variantes de HPV 18 encontradas era pertencente a linhagem A, enquanto as linhagens B e C não foram encontradas nesta população. Em relação as sublinhagens, A1 foi a mais prevalente (85.2%, 104/122), seguido pelas sublinhagens A4, A3 e A5, enquanto a sublinhagem A2 não foi encontrada.

Em um estudo realizado no Brasil, Rio de Janeiro por Vidal *et al.*, (2016) com uma coorte de 494 mulheres com câncer cervical invasivo, 71 mulheres apresentaram HPV 18. Dentre estas, aproximadamente 70% eram pertencentes a linhagem A, 19% eram pertencentes a variante B e não houve detecção da variante C.

Em um estudo realizado na Holanda por King *et al.*, (2016) em 835 indivíduos homens e mulheres, identificou-se o HPV 18 em 108 indivíduos. Destes, 86% eram pertencentes a variante A, 14% eram pertencentes a variante B. Também foi identificado a variante C (não europeia) em 15 amostras, sendo a maioria destas retiradas de indivíduos de nacionalidade não-holandesa.

Em um estudo de Chen *et al.*, (2015) com 711 amostras positivas para o HPV 18 oriundas de 39 países foram identificadas baseadas em três linhagens filogenéticas (A, B e C). Houve predominância da variante A em todas as regiões, exceto na África Subsaariana onde predominou-se a variante B. A variante C ocorreu somente na África (CHEN *et al.*, 2015). Para as amostras pertencentes a variante A, predominou-se a sublinhagem A1 (248 amostras). Similarmente, para a variante B predominou-se a sublinhagem B1 (46 amostras).

No estudo de Perez *et al.* (2014) analisou-se a prevalência e associação com lesões cervicais de alto grau de diferentes linhagens de variantes HPV16/18 em um estudo caso-controle, incluindo 217 casos (neoplasia intraepitelial cervical grau 2 ou

grau 3 e câncer) e 116 controles (sem NIC2 ou NIC3 em acompanhamento de dois anos). Entre as linhagens do HPV 18, foram identificadas as linhagens A (32/88.9%) e B (4/11.1%). As linhagens B e A foram encontradas, respectivamente, em 1/23 dos casos controle e em 2/5 dos casos com NIC. Identificou-se, também, que a linhagem B poderia estar associada a um risco aumentado de NIC3 em comparação com a linhagem A, mas a associação não foi significativa.

No Brasil, Villa *et al.*, (2000) buscaram determinar as diferenças geográficas entre as variações intratipo de HPV 18 e sua associação com o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical. A prevalência mais elevada detectada (80-90%) foi a linhagem A, seguido da linhagem B.

No estudo realizado por Schiffman *et al.*, (2011) em mulheres com citologia normal e lesões cervicais de diferentes graus, apresentou frequência menor da linhagem B (22,6%), com relação as linhagens de A e C (77,4%). O estudo realizado por Burk *et al.*, (2003) nos Estados Unidos em 19 mulheres com diagnóstico de carcinoma *in situ* ou câncer invasivo, apontaram a linhagem A (47%) como a mais frequente, seguido pela linhagem C (36,8%) e B (15,7%).

No presente estudo em São Luís do Maranhão relata-se que a linhagem mais prevalente na população estudada foi também a linhagem A para o HPV 18. Os estudos citados, evidenciam maior prevalência da variante A em populações miscigenadas, como é o caso do Brasil.

Estudos também indicam uma variação na distribuição dos tipos de HPV entre estes os tipos histológicos. O HPV 16 tem estado mais associado ao carcinoma epidermoide; já o HPV 18 apresenta maior prevalência em adenocarcinoma do que o HPV 16 (ALTEKRUSE *et al.*, 2003; BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009). Isto denota uma tendência a causar adenocarcinoma em comparação com outros genótipos do HPV. Estudos também indicam que as diferentes linhagens de HPV 18 coevoluiram com a árvore filogenética de três ramos humanos, asiáticos, brancos e africanos (XU *et al.*, 2018).

Neste estudo, do total, 95 amostras (79.1%) foram classificados como carcinoma epidermoide (CE) e 11 amostras (9.1%) como adenocarcinomas. Dentre as amostras positivas para o HPV 18, 6 apresentaram carcinoma epidermoide e 3 eram adenocarcinomas. Também identificou-se neoplasia maligna indiferenciada em 3 amostras e carcinoma indiferenciado em 1 amostra de cancer de colo do útero.

Em relação ao tipo histológico e as variantes encontradas, 41.6% das pertencentes a variante A foram classificadas como carcinoma epidermoide, seguido por 25% de adenocarcinoma. Para a variante B, uma (8.3%) foi classificada como carcinoma epidermoide e uma (8.3%) como neoplasia maligna indiferenciada.

Comparando-se com os tipos histológicos encontrados, entre as pacientes com carcinoma epidermoide, predominou-se as sublinhagens A3 e A4 (média de 57.5 anos \pm 14.9), já entre as pacientes com adenocarcinoma predominou-se as sublinhagens A1 e A2 (média de 42 anos \pm 5.5).

No estudo de Chen *et al.*, (2015) analisou-se a distribuição das variantes do HPV 18 de acordo o tipo histológico (CE ou ADC). Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa entre os tipos histológicos encontrados.

No estadiamento tumoral deste estudo em São Luís do Maranhão, das 120 mulheres, 45 pacientes (37.5%) pertenciam ao estadio IIIB, seguido por 31 pacientes no estadio IIB (25.8%), portanto mais da metade em estadios avançados. Aquelas pacientes positivas para HPV 18, do total, 5 (41.6%) encontravam-se no estadio IIB. Também foram encontrados os estadios: I e IIIB (2/16.6%); e os estadios IB, IIA e IVB (1/8.4%). Na literatura o estadiamento e a relação com a presença do HPV 18 é de pior prognóstico entre pacientes com câncer de colo de útero.

Neste estudo sobre HPV 18 as mulheres com câncer do colo do útero estavam na faixa etária 28 e 76 anos de idade, confirmando 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 números 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 estadio da doença e a sobrevivência.

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).

Em relação aos aspectos sociodemográficos, 70% das mulheres autodeclararam-se pardas, 51.67%, casadas ou em união consensual, 55% apresentavam renda de 1 a 2 salários mínimos e 42.50% apresentavam escolaridade até o ensino fundamental. 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 a 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 (JAIN *et al.*, 2017). 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 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. Identificou-se, também, 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 também foi reportado 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).

É necessário o desenvolvimento de novos estudos para que se possa entender a origem e progressão do câncer, bem como a relação entre o HPV 18 e variantes e o desenvolvimento de lesões precursoras tumorais do colo do útero. Os dados aqui apresentados poderão auxiliar o desenvolvimento de futuros estudos epidemiológicos acerca de variantes do HPV 18, assim como na criação de estratégias para o combate dos tipos que permanecerem 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 18 eram, em sua maioria, acima dos 40 anos de idade, sendo 53,4 anos para a variante A e 37 anos para a variante B;

– Os tipos histológicos mais prevalentes entre as mulheres com HPV 18 foram carcinoma epidermóide, seguido pelo adenocarcinoma e neoplasia maligna indiferenciada;

– Em relação as variantes do HPV 18 encontradas, predominou-se a linhagem A, seguido da linhagem B. A linhagem C não foi encontrada no estudo;

– Dentre as sublinhagens do HPV 18, predominou-se as sublinhagens A1, A3 e A4;

– O presente estudo é pioneiro no Maranhão, contribuindo para o conhecimento dos tipos de HPV e das variantes de HPV 18 circulantes na população maranhense, bem como a compreensão sobre a associação das variantes e a progressão do câncer do colo do útero.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AMARO-FILHO, S. M. *et al.* A Comparative Analysis of Clinical and Molecular Factors with the Stage of Cervical Cancer in a Brazilian Cohort. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). Manual de Estadiamento do Câncer. Tradução: Daniela Dornelles Rosa. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 432 p.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC). Manual de Oncologia Clínica. Estadiamento do Câncer. Tradução: Rafael E. Pollock. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006. 919 p.
- ANACKER, D. C.; MOODY, C. A. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Res.** 2017 Mar 2;231:41-49. doi: 10.1016/j.virusres. 2016.11.006.
- 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.
- ARROYO, S. L.; BASARAS, M.; ARRESE, E.; HERNÁEZ, S.; ANDÍA, D.; ESTEBAN, V. *et al.* Human Papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao , Spain. **Virology Journal**, v. 9, p. 1–8, 2012.
- AWUA, A. K.; ADANU, R.M.K.; WIREDU, E.K.; AFARI, E.A.; ZUBUCH, V.A.; ASMAH, R.H.; SEVERINI, A. 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.

BATISTA, J.E. Prevalência de tipos específicos de HPV e anormalidades citológicas em mulheres quilombolas. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia 2014. 137f.

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**, 2006 Mar 1;118(5):1071-6.

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, 2017. doi: 10.1186/s12885-017-3425-z.

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

BOSCH, F.; MANOS, M. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 87, n. 11, 1995.

BOSCH, F.X.; ROBLES, C.; DIAZ, M.; ARBYN, M.; BAUSSANO, I.; CLAVEL, C. *et al.* HPV-FASTER: Broadening the scope for prevention of HPV-related cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13:119–132.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de informações sobre mortalidade. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 13 set. 2017.

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.; 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.

CAMBRUZZI, E.; ZETTLER, C. G.; ALEXANDRE, C. O. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma. **Pathol Oncol Res**, v. 11, n. 2, p. 114–120, 2005.

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.
- CAVALCANTI, S. M. B.; ZARDO, L.G.; PASSOS, M.R.; OLIVEIRA, L.H. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. **Journal of Infection**, v. 40, n. 1, p. 80–87, 2000.
- CAVALCANTI, S.M.; DEUS, F.C.; ZARDO, L.G.; FRUGULHETTI, I.C. OLIVEIRA, L.H. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1996 Jul-Aug;91(4):433-40.
- CAVALCANTI, S.M.; FRUGULHETTI, I.C.; PASSOS, M.R.; FONSECA, M.E.; OLIVEIRA, L.H. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1994 Oct-Dec;89(4):575-80.
- 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.
- 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**, v. 88, n. October 2002, p. 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.

DA SILVA BARROS, N.K.; COSTA, M.C.; ALVES, R.R.; VILLA, L.L.; DERCHAIN, S.F.; ZEFERINO, L.C.; *et al.* Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. **J Med Virol.** 2012 Jul;84(7):1143-50. doi: 10.1002/jmv.23312.

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 SANJOSE, S.; QUINT, ALEMANY, W.G.V.; L.; GERAETS, D.T.; KLAUSTERMEIER, J.E.; LLOVERAS, B. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncol** 2010; 11: 1048–56

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. DE. 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.

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

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.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major

patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.

FERNANDES, J. V. MEISSNER, R. V.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, T.A.; AZEVEDO, P.R.; DE AZEVEDO, J.W. *et al.* Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 6, p. 1321–1326, 2011.

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R.V.; CARVALHO, M.G.; FERNANDES, T.A.; AZEVEDO, P.R.; SOBRINHO, J.S. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Res Notes**, v. 3 , p. 96, 2010.

FERNANDES, J.V.; Carvalho, M.G.F.; de Fernandes, T.A.A.M.; Araújo, J.M.G.; Azevedo, P.R.M.; Azevedo, J.C.V. *et al.* Prevalence of human papillomavirus type 58 in women with or without cervical lesions in northeast Brazil. **Annals of medical and health sciences research**, v. 3, n. 4, p. 504–10, 2013.

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.

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.

GUIMARÃES, E.M.; BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S.D. Human papillomavirus detection in cervical dysplasias or neoplasias and in condylomata acuminata by in situ hybridization with biotinylated DNA probes. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1992 Jul-Aug;34(4):309-14.

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.

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.

HERRERO, R.; 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. **The New England Journal of Medicine**, p. 518–527, 2003.

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, 2017. 128 P.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2016**. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2015

- 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., SONSMAN, 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.
- 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. **Journal of Medical Virology**, 2016.
- LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L.C.; DE LUCENA BATISTA, R. *et al.* The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**. 2000 Mar;10(2):143-150.
- 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, 2015. doi: 10.11604/pamj.2015.22.26.7116.
- 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**. 2015 Oct 2;10:39. doi: 10.1186/s13027-015-0035-8
- 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**, 2017 May;1861(5 Pt B):1229-1236. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.11.007.

- 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**. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F24-33. doi: 10.1016/j.vaccine. 2012.05.089.
- 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**. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- 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, 2016. DOI: 10.1159/000452240.
- 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**. 2018 Jan 2;18(1):1. doi: 10.1186/s12905-017-0499-3
- NASCIMENTO, M.D.S.B.; VIDAL, F.C.B.; SILVA, M.A.C.N.; BATISTA, J.E.; BARBOSA, M.C.L.; MUNIZ FILHO, W.E. *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. **BMC Women's Health** (2018) 18:1
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C.; SOLOMON, D. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. **Comprehensive Cytopathology**, v. 60611, p. 77–90, 2008.
- NICOLÁS-PARRAGA, S.; GANDINI, C.; PIMENOFF, V.N.; ALEMANY, L.; DE SANJOSÉ, S.; XAVIER BOSCH, F. *et al.* HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 2909–2919, 2016.

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.

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

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.

OLIVEIRA, C.M.; FREGNANI, J.H.T.G.; CARVALHO, J.P.; LONGATTO-FILHO, A.; Levi, J.E. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC Cancer**, 2013, 13:357.

ONG, CHI-KEONG; CHAN, SHIH-YEN; M. CAMPO, SAVERIA; FUJINAGA, K.; MAVROMARA-NAZOS, P.; LABROPOULOU, V. *et al.* Evolution of Human Papillomavirus Type 18: an Ancient Phylogenetic Root in Africa and Intra-type Diversity Reflect Coevolution with Human Ethnic Groups. **Journal of Virology**, Nov. 1993, p. 6424-6431.

PÉREZ, S.; CID, A.; IÑARREA, A.; PATO, M.; LAMAS, M.J.; COUSO, B. Prevalence of HPV 16 and HPV 18 Lineages in Galicia, Spain. **PLoS One**. 2014 Aug 11;9(8):e104678. doi: 10.1371/journal.pone.0104678

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.

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

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.

PITTA, D.R.; CAMPOS, E.A.; SARIAN, L.O.; ROVELLA, M.S.; DERCHAIN, S.F. [Prevalence of HPV 16, 18, 45 and 31 in women with cervical lesions]. **Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia: revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 315–20, 2010.

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.

RABELO-SANTOS, S. H. *et al.* Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181–184, 2003.

RABELO-SANTOS, S. H. *et al.* Human papillomavirus-specific genotypes in cervical lesions of women referred for smears with atypical glandular cells or adenocarcinoma in situ. **Int J Gynecol Pathol**, v. 28, p. 272–278, 2009.

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. Estadiamento dos cancros ginecológicos : FIGO 2009. **Adenda**, p. 623–628, 2009.

RIBEIRO, A. A. Prevalência de tipos específicos de Papilomavírus humano (HPV) e relação com a severidade da lesão cervical em mulheres com exame citopatológico anormal. **Universidade Federal de Goiás**, 2009.

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.; 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.

SCHIFFMAN, M.; GLASS, A.G.; WENTZENSEN, N.; RUSH, B.B.; CASTLE, P.E.; SCOTT, D.R. *et al.* A long-term prospective study of type-specific human papillomavirus infection and risk of cervical neoplasia among 20,000 women in the Portland Kaiser Cohort Study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2011 July ; 20(7): 1398–1409. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0206.

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.

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.** 2017, 17;12(1):e0163509. doi: 10.1371/journal.pone.0163509.

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.

SUN, Z.; LU, Z.; LIU, J. Genomic Polymorphism of Human Papillomavirus Type 52 in Women from Northeast China. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 14962–14972, 2012.

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.

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

TJALMA, W.A.A., VAN WAES, T.R., VAN DEN EEDEN, L.E., BOGERS, J.J. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamos 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.** 2017; 231:128-138. doi: 10.1016/j.virusres. 2016.11.013.

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. *et al.* 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.

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.; WANG, L. Cervical Cancer Screening Among Adult Women in China, 2010. **The Oncologist**, v. 20, p. 627–634, 2015.

WENTZENSEN, N. Epidemiologie, Prävention und Früherkennung des Zervixkarzinoms. [Epidemiology, prevention and early detection of cervical cancer]. **Onkologie** (Berl). 2016; 22(10): 725–736. doi:10.1007/s00761-016-0092-7.

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, 2016. doi: 10.1590/0074-02760150330.

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.; KIVIAT, N.B.; HILDESHEIM, A.; GALLOWAY, D.A.; WHEELER, C.M.; HO, J.; KOUTSKY, L.A. Human Papillomavirus Type 16 and 18 Variants: Race-Related Distribution and Persistence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 15, p. 1045–1052, 2006.

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.

XU, H.H.; ZHENG, L.Z.; LIN, A.F.; DONG, S.S.; CHAI, Z.Y.; YAN, W.H. Human papillomavirus (HPV) 18 genetic variants and cervical cancer risk in Taizhou area, China. **Gene**. 2018 Mar 20;647:192-197. doi: 10.1016/j.gene.2018.01.037.

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.

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 LUIS

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 09:21:38		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 religião2 Católica3 Evangélica/Methodista/Batista/Presbiteriana/Protestante/Cristã4 Espiritismo de Candomblé/Umbanda/Africana5 Espiritismo Kardecista6 Budista7 Judaica8 Muçumana9 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/NR00000,00 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 <input type="checkbox"/> sim | 2 <input type="checkbox"/> não |
| 2 Inflamações | 1 <input type="checkbox"/> sim | 2 <input type="checkbox"/> não |
| 3 Infecções | 1 <input type="checkbox"/> sim | 2 <input type="checkbox"/> não |
| 4 Doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) | 1 <input type="checkbox"/> sim | 2 <input type="checkbox"/> não |
| 5 Outros _____ | 1 <input type="checkbox"/> sim | 2 <input type="checkbox"/> 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 Conseguiu 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) Tireiodopatia: (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 Journal of Medical Virology

25/12/2017

ScholarOne Manuscripts

 Reviews in Medical Virology

[# Home](#)
[# Author](#)
[# Review](#)

DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON TO EXIT THIS PAGE. PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to
Reviews in Medical Virology

Manuscript ID
RMV-2017-062

Title
HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 VARIANTS AND CYTOLOGY ASPECTS IN CERVICAL CANCER: REVIEW

Authors
Dos Santos, Gersonete Bastos
Cunha, Ana Paula
de Castro, Ialison
Pereira, Liwerboth
Da Silva, Rodrigo
Batista, Zulmira
Nascimento, Maria do Destumo

Date Submitted
29-Dec-2017

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,666.

[# @ScholarOneNews](#) | [# System Requirements](#) | [# Privacy Statement](#) | [# Terms of Use](#)

Anexo D: Artigo submetido**HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 VARIANTS AND CYTOLOGY ASPECTS IN CERVICAL CANCER: REVIEW**

Reviews in Medical Virology

**HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 VARIANTS AND CYTOLOGY ASPECTS IN CERVICAL CANCER: REVIEW**

Journal:	<i>Reviews in Medical Virology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dos Santos, Gerusinete Bastos ; Universidade Federal do Maranhao Cunha, Ana Paula; Universidade Federal do Maranhao de castro, lailson; Universidade Federal do Maranhao Pereira, Liwerbeth; Universidade Federal do Maranhao Da Silva, Rodrigo ; Universidade Federal do Maranhao Batista, Zulmira; Universidade Federal do Maranhao Nascimento, Maria do Desterro; Universidade Federal do Maranhao, Patology
Keywords:	Cervical Cancer, Human Papillomavirus 18, HPV 18 variants
Abstract:	Cervical cancer is the fourth most common cancer in the world, causing more than 265,000 deaths. More than 80% of the cases occur in developing countries. In Brazil, it is the third most frequent tumor among this population. The Human Papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections worldwide and plays a central role on the origin of cancer, with more than 200 types of HPV viruses identified, more than 30 of which are transmitted by sexual interactions. HPV 18 is the second most prevalent viral type in cervical tumors, and evidence suggests that variants of this HPV may interfere biologically and etiologically with the development of cervical cancer. However, geographic and racial variations cause increases in its persistence, and may be associated with more aggressive clinical manifestations, worse prognosis and a greater probability of cancer recurrence. HPV variants have recently been defined by a difference of approximately 1.0% between complete genomes of the same HPV type. For HPV 18, variants are classified between baseline strains (A, B and C) and additional substrains (A1 to A5 and B1 to B3) based on the sequencing of total viral DNA sequences. Studies have reported a strong relationship between HPV infection and the development of different degrees of cervical intraepithelial lesions (CIN), with cytological testing being the main form of detection of these lesions. HPV 16 and 18 are associated with increased chances of developing invasive intraepithelial lesions as well as progression to cervical cancer.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Review Only

HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 VARIANTS AND CYTOLOGY ASPECTS IN CERVICAL CANCER: REVIEW

Gerusinete Rodrigues Bastos dos Santos¹, Ana Paula Almeida Cunha¹, Lailson Oliveira de Castro¹, Liwabeth dos Anjos Pereira¹, Rodrigo Lopes da Silva¹, Zulmira da Silva Batista¹, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento¹

¹Federal University of Maranhão

Abstract

Cervical cancer is the fourth most common cancer in the world, causing more than 265,000 deaths. More than 80% of the cases occur in developing countries. In Brazil, it is the third most frequent tumor among this population. The Human Papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infections worldwide and plays a central role on the origin of cancer, with more than 200 types of HPV viruses identified, more than 30 of which are transmitted by sexual interactions. HPV 18 is the second most prevalent viral type in cervical tumors, and evidence suggests that variants of this HPV may interfere biologically and etiologically with the development of cervical cancer. However, geographic and racial variations cause increases in its persistence, and may be associated with more aggressive clinical manifestations, worse prognosis and a greater probability of cancer recurrence. HPV variants have recently been defined by a difference of approximately 1.0% between complete genomes of the same HPV type. For HPV 18, variants are classified between baseline strains (A, B and C) and additional substrains (A1 to A5 and B1 to B3) based on the sequencing of total viral DNA sequences. Studies have reported a strong relationship between HPV infection and the development of different degrees of cervical intraepithelial lesions (CIN), with cytological testing being the main form of detection of these lesions. HPV 16 and 18 are associated with increased chances of developing invasive intraepithelial lesions as well as progression to cervical cancer.

Keywords: Cervical Cancer, Human Papillomavirus 18, HPV 18 variants.

INTRODUCTION

Cervical cancer is the fourth most common type of cancer affecting women worldwide, with 265,000 deaths estimated. More than 80% of cases occur in developing countries (1,2). More than half a million women are diagnosed every year (3). It is the third most frequent tumor in Brazil, following breast and colorectal cancer (4). The National Cancer Institute (INCA) estimated that there were 16,340 new cases of cervical cancer in 2016, with an estimated risk rate of 15.85 cases per 100,000 women. It is a chronic disease that evolves from a non-invasive pre-malignant lesion and may acquire an invasive potential over a period of 5 to 6 years (5).

The etiology of cervical cancer is multifactorial. Risk factors range from viral aspects of HPV (subtype, viral load, single or multiple infection) to behavioral variables. Among behavioral factors, we may mention early sexual initiation, multiplicity of sexual partners, multiparity, smoking, precarious hygiene habits, malnutrition and difficulty of access to health services (6,7). Among the factors associated with HPV, we mention genetic differences between HPV types, which influence the development of precursor cancer lesions and viral load on the infected epithelium (8,9). The human papillomavirus (HPV) is the main etiologic factor of uterine cervix cancer, comprising up to 90% of cases (3), 80% of them occurring to individuals up to 50 years of age (10). In addition, women are more susceptible to the oncogenic effect of HPV because of the anatomical characteristics of the female genital tract, especially the histology of the genital mucosa (11).

The carcinogenicity of HPV is attributed to the viral genes E6 and E7, whose proteins interfere with the tumor-suppressor proteins p53 and Rb, respectively (12). The improvement in knowledge on the association of HPV with high-grade squamous intraepithelial lesions and cervical cancer, as well as a potential for pre-invasive lesion, justify studies of this subject (13). HPV has more than 170 genotypes identified, but only 12 genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) are recognized as high-risk types by the International Cancer Research (IARC) and the World Health Organization (WHO) (3,14,15). HPV 16 and 18 contribute to the

development of 87% of invasive cervical cancer (ICC), 89% of squamous cell carcinoma (SCC) and 84% of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). Although HPV 16 causes 56% of ICC, 55% of SCC and 45% of HSIL, and the HPV 18 causes about 17% of ICC, 12% of SCC and 6% of HSIL, such values vary depending on geographical location (16).

HPV 18 is the second most carcinogenic type of HPV, but most infections are asymptomatic (17). The factors that favor a low rate of infection by this virus on the development of cervical cancer are not well defined, but studies indicate that the genetic variability of HPV 18 plays an important role in the progression of invasive cervical cancer (18,19). In view of the potential of HPV 18 and its variants for the development of intraepithelial lesions and the development of cervical cancer, we sought to analyze data related to advances in the understanding of HPV on the progression of cancer in the world literature.

MATERIAL AND METHODS

This is a narrative literature review. The bibliographic survey was carried out by consultation in relevant databases for the production of knowledge on health: PubMed (*US National Library of Medicine*), Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (LILACS), SCIELO (*Scientific Electronic Library Online*) and MEDLINE.

Initially, a search was made using the descriptors that contemplated the subject studied according to the DECS (Descriptors in Health Science): *Human Papillomavirus 18*, *Genomic Structural Variation* and *Uterine Cervical Cancer*.

After on-line searches, titles and abstracts of all articles identified were analyzed. Studies that met the established inclusion and exclusion criteria were obtained in full. Publications containing full texts in English, from 2007 to August 2017, were included. Articles not related to the proposed subject published in languages other than the selected languages were excluded, as well as those that were not available on-line in full.

We found a large number of articles referring to the topic HPV, but when we typed the keywords "*Human papillomavirus 18*, *HPV 18 Variant* and *Uterine*

Cervical Cancer" in the selected databases, we found fewer articles that fitted this study.

1) Molecular aspects of HPV

The Human Papillomavirus is a small non enveloped virus with a double DNA strand of approximately 8 kb (20). HPV 18 belongs to the alpha genus and is classified as high oncogenic because it is closely associated with the development of anogenital cancer (21). It has a well-conserved genome among different genera, but it is believed that there is a correlation between genomic structure, tropism for a specific type of epithelium and type of lesion produced by the virus (22). The genome is formed by three main regions: the control region, called LCR (*Long Control Region*), region E (*early*), which encode proteins expressed initially in the lifecycle of the virus (E1 to E8), and region L (*late*), which encodes structural proteins for the formation of the viral capsid (23).

HPV is an epitheliotropic virus, and its infection depends on the level of differentiation of keratinocytes. The infection starts from microlesions in the basal layer of the cervical epithelium, leading to the entry of viral DNA into the host cell and the amplification of viral DNA in an episomal form (24,25). After basal cell replication and the entry into the suprabasal layer, the virus initiates the process of gene expression associated with differentiation of epithelial cells. Upon reaching the upper layers, the virus initiates the replication of a high number of copies of the viral DNA and begins to express the L1 and L2 genes, resulting in the production of new virions, which will be released on the epithelial surface (26). An efficient amplification of the HPV genome requires the combined action of several viral genes, including E6 and E7, which are the main genes responsible for carcinogenesis (27,28). The mechanism by which HPV leads to malignant transformation is associated with viral load, site, persistence of infection and interaction of the viral oncogenes E6 and E7, which are actively transcribed in virus-infected cells (28)(Chen et al., 2015). Studies report that the E6 gene interacts with the p53 protein, while the E7 interacts with pRB (retinoblastoma) to block the activity of these tumor suppressor proteins (29). The degradation of cellular proteins by viral proteins associated with the cell cycle compromises the integrity of the replicated DNA, causing instability in the DNA of the cell and the abnormal proliferation of cells, favoring tumor development (20,29).

2) Epidemiology of HPV 18 and cervical cancer

Approximately 445,000 cases of cervical cancer are reported every year in developing countries (30). In developed countries, it accounts for less than 1% of all cancers in women, with 83,000 cases a year (30). On a global scale, HPV-16 and HPV-18 together account for 71% of cases of cervical cancer (31). Specifically, 60.6% (95% CI: 59.6-61.6) of the cases are attributed to HPV-16 and 10.2% (95% CI: 9.6-10.9) to HPV-18 (WHO, 2017).

In a study by Wu et al. (2017), the authors reported that, in a screening with 11,064 Chinese women aged 21-65, there was a prevalence of 1.6% of HPV 16, while HPV 18 was present in 0.6% of the women analyzed. In a study by Muentes et al. (2016) with 1,581 women, HPV 16 was the most commonly detected type (87 cases), followed by HPV 33 (72 cases) and HPV 18 (four cases).

Coscia et al. (2015) also reported a higher prevalence of HPV 16 (35%) in a study with 822 patients, while HPV 18 obtained a percentage of 4%. A study by Iwata et al. (2015), conducted with 357 Japanese women aged 20-50 years, found that 270 women had HPV infections, 59 of them had HPV 16, and 19 women had HPV 18. A study occurred in 2015 obtained similar data in a study with 427 women with cervical cancer. They reported that 30.4% of women had HPV 16 and 7% had HPV 18 (32).

However, some studies have shown a high prevalence of HPV 18 in comparison with HPV 16. In a study by Manga et al. (2015) conducted with 209 women in Northeast Nigeria, there was a prevalence of 44.7% of women with HPV 18, followed by 13.2% of women with HPV 16. Similarly, a study by Auwai et al. (2013) with 300 women in Kano, northern Nigeria, described a prevalence of 23.7% of HPV 18 and 15.8% of HPV 16 among the women analyzed. There was a predominance of HPV 18 in Nigeria, contrasting with the general global tendency (33). Such studies justify the results linking them to geographic variations, cultural habits and population lifestyle, or to the technique used to detect HPV (34,35).

3) HPV 18 variants in women with cervical cancer

HPV variants have recently been defined by an approximately 1.0% difference between complete genomes of a same type of HPV (17,36,37). The interest in this field increases fast since, despite the relationship between different HPV genotypes and a well-established cancer development, the reason why only some lesions associated with high-risk genotypes progress to invasive cancer remains undefined (38,39). Studies related to genetic variability have demonstrated that intra-type variations of HPVs may influence viral persistence and progression to invasive cancer, interfering biologically and etiologically with the development of cancer (27,29).

Based on common phylogenetic patterns of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the L1 viral genomic region, HPV 18 variants were originally classified as European (E), Asian-American Indian (AA), or African (AF) (28). It is noteworthy that the African type had two substrains: African 1 (Afr-1) and African-2 (Afr-2) (40). This classification has been replaced for a sequencing approach to the total viral genome, establishing baseline strains (A, B and C) and additional substrains (A1 to A5 and B1 to B3), which can be translated into the previous nomenclature (A1 and A2 = AA, A3 and A5 = E and B/C = AF). The differences between strains of defined variants are 1.0% and among substrains are 0.5-0.9% (28,40,41).

Despite this new nomenclature, many studies still use the old classification. Studies report that the diversity in the oncogenic potential of HPV 18 variants is associated with geographic and racial distribution (39,42). In this context, according to a study by Xi et al. (2007), the European variant persists for longer in Caucasian women, while the African and Asian-American Indian variant persists for longer in African-American women. In a study by Arroyo et al. (2012) conducted in Spain, the authors reported that of the 56 variants found, 25 were European (56.8%), 10 were African (22.7%) and 5 were Asian-American Indian (11.4%). Sun et al. (2012) conducted a study in China with 65 HPV 18-positive women and found that 81.5% of them had the AA variant, while 18.5% had the E variant (18.5%), and no AF variant was found among this population. In a study conducted in southwest China, HPV 18 variants have been shown to have different biological and biochemical effects, since some of them may result in a greater transformation efficiency, more aggressive clinical manifestations, a greater likelihood of cancer recurrence and a worse prognosis (43).

In relation to tumor histology, some studies suggest that there is no evidence that different HPV 18 variants were associated with a specific tumor histology type (Arias-Pulido et al., 2005). In a study by Meza-Menchaca et al. (2013), the variant E was found almost exclusively in invasive lesions, while the AF variant was predominantly found in normal or pre-invasive lesions, and the AA variant in invasive squamous tumors. Other studies suggest that the Asian-American Indian strain is 4 times more common in adenocarcinoma than the European strain (23,44).

In addition, studies have reported that HPV 18 infections are generally more persistent and associated with pre-invasive lesions. Therefore, an early detection of HPV 18 variants is essential because it allows controlling and treating precursor lesions and reducing the incidence of invasive cervical cancer (35).

3) Cytology and Precursor Lesions and Cervical Cancer Detection

Studies have reported a strong relationship between HPV infection and the development of different degrees of cervical intraepithelial lesions that may progress to cancer (13,45). Currently, the Pap smear test is the main method of tracking cervical lesions (45). The standard diagnostic criterion is based on the Bethesda 2001 system, which recommends testing for HPV in cases of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) (46). The genetic test through the collection of swab cervicovaginal to test the presence of DNA of high-risk oncogenic viral types presents high sensitivity when compared to cervical cytology (13).

The estimated risk of developing cervical intraepithelial lesion (CIN) 2 or more and the establishment of cancer within 5 years depend on factors such as high-risk oncogenic HPV infection, previous cytological results, age and HPV vaccination (46). Among women submitted to the Papanicolaou method, about 10% have squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and 5-10% have malignant lesions (47). Universally, the oncogenic potential of HPV 16 and 18 is known to be higher than the other types considered as high risk, with more than 70% of cases of cervical cancer being associated with these two subtypes (Schiffman et al, 2018). In addition, the cumulative incidence of cervical intraepithelial neoplasia 3 (CIN3) is 10% after 3 years of a positive HPV test 18 (45).

Studies have also shown that over 85% of women with cervical intraepithelial lesions have high-risk HPV DNA. In addition, the risk of developing high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) is 14% for HPV-18-infected women, 18% for HPV-16-infected women and 3% for women with other high-risk types (47).

Recent data suggest that coinfections with multiple viral HPV types occur in 5-30% of infected women (Schiffman et al, 2018). A study by Samimi (2017) examined the association between HPV-specific genotype patterns and the sensitivity of the Pap smear test in women with cervical lesions precursor to cancer. They identified that low-grade lesions were associated with multiple infections or other high-risk types except HPV 16 and 18. On the other hand, high-grade lesions were more frequently associated with HPV16 and 18 infections (45).

Thus, HPV infection, mainly types 16 and 18, is considered predictive of progression of LSIL and CIN lesions after abnormal cytology. It is evident the importance of the cytological test for the identification of these lesions and for the reduction of incidence and death rates due to cervical cancer.

FINAL CONSIDERATIONS

HPV 18 is the second most common type of virus in women with cervical cancer. In addition, differences in oncogenicity among HPV viral types may vary geographically and ethnically. Despite advances in knowledge, cervical cancer morbidity and mortality rates, especially due to the presence of HPV 18, remain high in developing countries because it is a slow-onset pathology and generally without an initial clinical manifestation, and mainly because it is a sexually transmitted infection. The cytological test allows the early detection of intraepithelial lesions and is established as an important tool for the prevention of cervical cancer.

REFERENCES

1. Bahls L, Yamakawa R, Zan 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. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1478):1–15.
2. Barroeta JE, Adhikari-Guragain D, Grotkowski CE. Cervical cancer screening in the era of HPV vaccination: A review of shifting paradigms in cytopathology. *Diagn Cytopathol.* 2017;(November 2016):1–12.
 3. Yin F, Wang Y, Chen N, Jiang D, Qiu Y, Wang Y, et al. neutralizing antibody responses comparable to those induced by the Gardasil quadrivalent vaccine in rhesus macaque model. *Papillomavirus Res [Internet].* 2017;3(December 2016):85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pvr.2017.02.005>
 4. INCA. Estimativas 2016. Incidencia do Cancer no Brasil. Rio de Janeiro; 2015.
 5. Mezei AK, Armstrong HL, Campos NG, Mitchell SM, Sekikubo M, Byamugisha JK, et al. Cost-effectiveness of cervical cancer screening methods in low and middle-income countries: a systematic review. *Int J Cancer.* 2017;141(3):437–336.
 6. Martins TR, Oliveira CM De, Rosa LR, Centrone CDC, Luiza C, Rodrigues R, et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. *Viol J [Internet].* 2016;13(138):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0594-3>
 7. Veo CAR, Saad SS, Fregnani JHTG, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, Resende JCP, 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 Biol.* 2015;36(7):5399–405.
 8. 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. *Pathol Res Pract [Internet].* 2016;212(9):804–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2016.06.011>
 9. Grabowski MK, Kong X, Gray RH, Serwadda D, Kigozi G, Gravitt PE, et al. Partner Human Papillomavirus Viral Load and Incident Human Papillomavirus Detection in Heterosexual Couples. *J Infect Dis.* 2016;213:948–56.
 10. Entiauspe LG, Silveira M, Nunes EM, Basgalupp SP, Stauffert D, Dellagostin OA, et al. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2014;45(2):689–94.
 11. Coscia MF, Monno R, Ballini A, Mirgaldi R, Dipalma G, Pettini F, et al. Human

- papilloma virus (HPV) genotypes prevalence in a region of South Italy (Apulia). *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(3):248–51.
12. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol* [Internet]. 2016;76:S49–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.11.015>
 13. Schiffman M, Kinney WK, Cheung LC, Gage JC, Fetterman B, Poitras NE, et al. Relative Performance of HPV and Cytology Components of Cotesting in Cervical Screening. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2018;110(November 2017):1–8.
 14. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Kaufmann AM, Skenderi A, Hagemann I, et al. Human papillomavirus E7 protein detection as a method of triage to colposcopy of HPV positive women , in comparison to genotyping and cytology . Final results of the PIPAVIR study. *Int J Cancer*. 2017;141:519–30.
 15. Muentes DGG, Rodriguez LKG, Galarraga RIB, Carpio FA, Cabezas JCR. Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women. *Rev Bras Epidemiol*. 2016;19(1):160–6.
 16. Rezvani MR, Shams M, Sayaadi M, Beigi P, Shams M. Assessment the prevalence of high-risk human papillomavirus types 16 and 18 in 15 to 45 years old women. *Arch Med Lab Sci*. 2016;2(4):117–22.
 17. 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. *Int J Cancer*. 2016;139:2687–97.
 18. Li WJ, Xu HX, Chen ZH, Xu WD, Wu YJ. Characteristics of Carcinogenic Human Papillomavirus Infection in Suzhou : Epidemiology , Vaccine Evaluation , and Associated Diseases. *J Med Virol*. 2016;
 19. Wu Z, Qin Y, Yu L, Lin C, Wang H, Cui J, et al. Association Between Human Papillomavirus (HPV) 16 , HPV18 , and Other HR-HPV Viral Load and the Histological Classification of Cervical Lesions : Results From a Large-Scale Cross-Sectional Study. *J Med Virol*. 2017;541(November 2016):535–41.
 20. Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2017;1–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693417301189>
 21. Nogueira Dias Genta ML, Martins TR, Mendoza Lopez R V., Sadalla JC, de Carvalho JPM, Baracat EC, et al. Multiple HPV genotype infection impact on

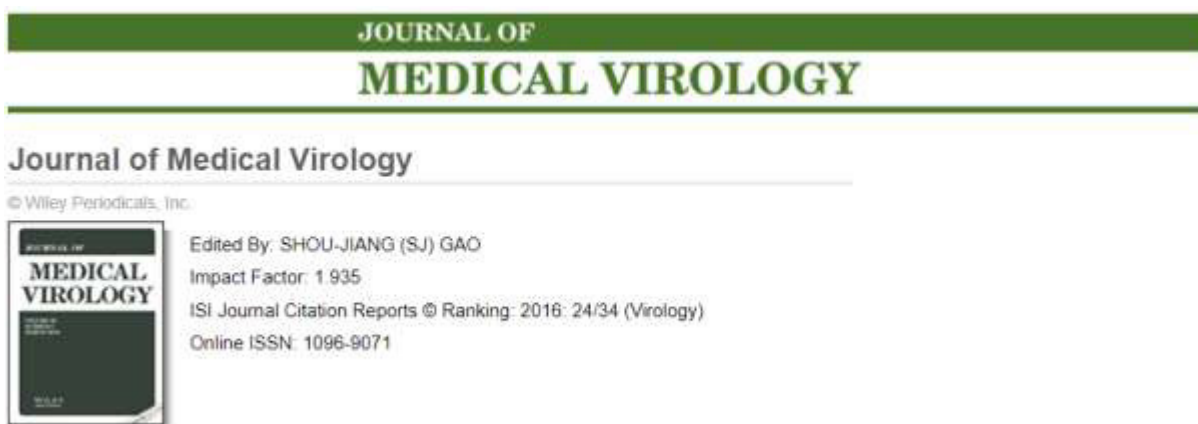
- invasive cervical cancer presentation and survival. Consolaro MEL, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Aug 22 [cited 2017 Aug 23];12(8):e0182854. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28829791>
22. Tommasino M. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.013>
 23. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009;12(5–6):281–90.
 24. Castle PE, Rodriguez AC, Porras C, Herrero R, Schiffman M, Gonzalez P, et al. A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. *Sex Transm Dis Dis*. 2007;34(11):849–55.
 25. Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol*. 2016;238(2):166–79.
 26. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Primer*. 2016;2:1–20.
 27. Vidal JPCB, Felix SP, Chaves CBP, Patury P, Franco VF, Morais EA de, et al. Genetic Diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian Patients With Invasive Cervical Cancer. *J Med Virol*. 2016;88:1279–87.
 28. Chen AA, Gheit T, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *J Virol*. 2015;89(20):10680–7.
 29. King AJ, Sonsma JA, Vriend HJ, Van Der Sande MAB, Feltkamp MC, Boot HJ, et al. Genetic diversity in the major capsid L1 protein of HPV-16 and HPV-18 in the Netherlands. *PLoS One*. 2016;11(4):1–11.
 30. WHO. Weekly epidemiological record. Switzerland; 2017.
 31. Halle MK, Ojesina AI, Engerud H, Woie K, Tangen IL, Holst F, et al. Clinicopathologic and molecular markers in cervical carcinoma: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2017;(June). Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937817307329>
 32. Nakamura Y, Matsumoto K, Satoh T, Nishide K, Nozue A. HPV genotyping for triage of women with abnormal cervical cancer screening results: a multicenter prospective study. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(5):891–974.
 33. Auwai IK, Aminu M, Atanda AT, Tukur J, Sarkinfada F. Prevalence and risk factors of high risk human papillomavirus infections among women attending gynaecology clinics in Kano, Northern Nigeria. *Bayero J Pure Appl Sci*.

- 2013;6(1):67–71.
34. Manga MM, Fowotade A, Abdullahi YM, El-Nafaty AU, Adamu DB, Pindiga HU, et al. Epidemiological patterns of cervical human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2015;10(39):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-015-0035-8>
 35. Meza-menchaca T, Williams J, Zepeda RC, Services H, Centre S. A Low Density Microarray Method for the Identification of Human Papillomavirus Type 18 Variants. *Sensors*. 2013;12:12975–93.
 36. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013;445(0):232–43.
 37. Meng Y, Ma D, Wu P. A Common Clinical Dilemma: Management of Persistent hrHPV Infection. *Trends in Cancer* [Internet]. 2017;3(5):315–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803317300651>
 38. Zuna RE, Moore WE, Shanesmith R, Dunn ST, Wang S, Schiffman M, et al. Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population Rosemary. *Int J Cancer*. 2009;125(11):2609–13.
 39. Sun Z, Lu Z, Liu J. Genomic Polymorphism of Human Papillomavirus Type 52 in Women from Northeast China. *Int J Mol Sci*. 2012;12:14962–72.
 40. Awua AK, Adanu RMK, Wiredu EK, Afari EA, Zubuch VA, Asmah RH, et al. Unique LCR variations among lineages of HPV16, 18 and 45 isolates from women with normal cervical cytology in Ghana. *Virology* [Internet]. 2017;14(1):85. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0755-z>
 41. 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 Infect Dis* [Internet]. 2017;17(1):502. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2592-5>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28720082>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5516327>
 42. Arroyo SL, Basaras M, Arrese E, Hernández S, Andía D, Esteban V, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical

manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virology* [Internet]. 2012;9(1):258. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3495774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

43. Shen M, Ding X, Li T, Chen G, Zhou X. Sequence Variation Analysis of HPV-18 Isolates in Southwest China. *PLoS One*. 2013;8(2).
44. Boer MA De, Peters LAW, Aziz MF, Siregar B, Cornain S. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6 / E7 polymorphisms in three countries. *Int J Cancer*. 2005;114:422–5.
45. Samimi SA, Mody RR, Goodman S, Luna E, Armylagos D. Do Infection Patterns of Human Papillomavirus Affect the Cytologic Detection of High-Grade. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;1–6.
46. Kiseki K, Tsukahara Y, Tajima N, Tanaka A, Horimoto A, Hashimura N. Influence of co-infection complicated with human papillomavirus on cervical intraepithelial neoplasia development in patients with atypical squamous cells of undetermined significance. *J Infect Chemother*. 2017;23(12):814–9.
47. Kim YEESUK, Lee S, Zong N, Kahng J. Clinical progress of human papillomavirus genotypes and their persistent infection in subjects with atypical squamous cells of undetermined significance cytology: Statistical and latent Dirichlet allocation analysis. *Exp Ther Med*. 2017;12:3032–8.

Anexo E: Normas da Revista Medical Virology para Submissão



Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

For additional tools visit [Author Resources](#) - an enhanced suite of online tools for Wiley InterScience journal authors, featuring Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.

Author Guidelines

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

AIMS AND SCOPE. Journal of Medical Virology provides a means of rapid publication of original scientific papers on fundamental as well as applied research concerning viruses affecting humans. These include reports describing the characterisation, diagnosis, epidemiology, immunology and pathogenesis of human virus infection, as well as basic studies on virus morphology, genetics, replication and host-cell interactions.

Article types for submission:

Research Articles describe significant, original, and complete findings in medical virology. A Research Article consists of an Abstract of no more than 200 words, Text of no more than 4,000 words (including Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion), no more than 50 References, and illustrations that are limited to 6 items (figures and tables).

Short Communications describe important, original, and urgent observations that are narrower in scope than those described in Research Articles. A Short

Communication consists of an Abstract of no more than 100 words, Text of no more than 2,000 words (including Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion), no more than 20 References, and illustrations that are limited to 2 items (figures and tables).

Reviews are invited by the Editor. They cover the most up-to-date and significant advancements in the field. A Review consists of an Abstract of no more than 150 words, Text of no more than 5,000 words, no more than 100 References, and illustrations that are limited to 4 items (figures and tables). Please do not submit unsolicited Reviews.

Commentaries provide observation or analysis of an article. They typically appear in the same issue as the original article but may refer to any article published within the preceding 12 months. They are provided by the journal Editor or a peer reviewer. They may also be submitted by authors on an invite-only basis. Commentaries should be submitted in letter format with a maximum of 1,000 words, 10 references, and 1 item (figure and table).

Letters to the Editor are critiques of articles published in JMV in the last 12 months. A Letter should not exceed 750 words and contain no more than 10 references and 1 item (figure or table).

Supplemental Material (for online publication only) should be submitted with the manuscript for peer-review and approval by the Editors. Supplemental material, which should be referenced in the body of the main text, can include figures, tables, movies, and animations. We recommend using the following file types: Word Doc or PDF for text, tif or eps format for images, and movies in mov, wmv, mpg, or avi format. Online-only Supplemental Material will be published as submitted. It will not be copyedited or formatted by the publisher in any way. The accuracy and presentation of Supplemental Material is the sole responsibility of the authors. Please try to restrict individual file sizes to 10Mb maximum (zipped or unzipped).

NOTE: The journal no longer accepts Case Studies.

MANUSCRIPTS should be submitted via the on-line system at <http://mc.manuscriptcentral.com/jmv>. Number all pages in sequence and begin each section on a new page. Manuscripts should be divided into the following sections:

TITLE PAGE. This should contain the complete title of the paper; the names, titles, and affiliations of all authors (lists of degrees and diplomas should not be included); the institution at which the work was performed; the name, address, telephone, and email address for all correspondence; and a shortened title, not more than 40 characters, to be used as a running head. It is not possible to include the statements that “two authors contributed equally” or have two “first co-authors”.

ABSTRACT. This should be a factual condensation of the entire work and include statements of the problem, method of study, results, and conclusions. The abstract may not exceed 250 words.

KEY WORDS. Supply a list of three to six key words (without repeating words in the title), pertinent to the article, which will appear below the abstract and will be included in the index at the end of the volume.

SEARCH ENGINE OPTIMIZATION. Driving usage and readership is critically important to raising the visibility of your published research. One of the key factors in sustaining long-term usage is through search engine optimization (SEO). Below is a list of suggested ways of maximizing your SEO.

1. Make sure your article title is SEO-friendly. It should be descriptive, and it must include a key phrase from your topic. Key words should appear within the title's first 65 characters.
 2. Provide up to five topic-specific key words or phrases in the key word field.
 3. Be sure your key words and phrases appear in your abstract several times, but don't go overboard or the search engine may kick you out.
 4. When referencing authors, be consistent. Use their names as they generally appear in past online publications.
 5. When appropriate, use your key words in article section headings.
- Remember: They can't read it if they can't find it!

For more detailed information on SEO, including helpful examples, go to <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

VIRUS NOMENCLATURE. Each virus should be identified at least once, preferably in the *Introduction* or *Materials and Methods* section, using formal family, genus, and species terms, and where possible by using a precise strain designation term as developed by an internationally recognized specialty group or culture collection. Please note that the word type is not used before species designations that include a number. Formal terms used for virus families, genera, and species, should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., McGeoch, D.J., Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., and Wickner, R.B. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh ICTV Report*, Academic Press. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

Formal taxonomic nomenclature

In formal taxonomic usage, the first letters of virus order, family, subfamily, genus and species names are capitalized and the terms are printed in italics. Other words in the species name are not capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns, for example *West Nile virus*. Informal usage, the name of the taxon should precede the term for the taxonomic unit; for example: "the family *Paramyxoviridae*," "the genus *Morbillivirus*." The following represent examples of full formal taxonomic terminology:

- 1 Order *Mononegavirales*, Family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus*,

Species *Rabies virus*.

2 Family *Poxviridae*, subfamily *Chordopoxvirinae*, genus *Orthopoxvirus*, species *Vaccinia virus*.

3 Family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*, species *Poliovirus*.

4 Family *Bunyaviridae*, genus *Tospovirus*, species *Tomato spotted wilt virus*.

Vernacular taxonomic nomenclature

In formal vernacular usage, virus order, family, subfamily, genus and species names are written in lower case Roman script; they are not capitalized, nor are they printed in italics or underlined. In informal usage, the name of the taxon should not include the formal suffix, and the name of the taxon should follow the term for the taxonomic unit; for example "the picornavirus family," "the enterovirus genus." One particular source of ambiguity in vernacular nomenclature lies in the common use of the same root terms in formal family, genus or species names. Imprecision stems from not being able to easily identify in vernacular usage which hierarchical level is being cited. For example, the vernacular name "paramyxovirus" might refer to the family *Paramyxoviridae*, the subfamily *Paramyxovirinae*, or one species in the genus *Respirovirus*, such as *Human parainfluenza virus 1*. The solution in vernacular usage is to avoid "jumping" hierarchical levels and to add taxon identification wherever needed. For example, when citing the taxonomic placement of *Human parainfluenza virus 1*, taxon identification should always be added: "*Human parainfluenza virus 1* is a species in the genus *Respirovirus*, family *Paramyxoviridae*." In this example, as is usually the case, adding the information that this virus is also a member of the subfamily *Paramyxovirinae* and the order *Mononegavirales* is unnecessary.

It should be stressed that italics and capitals initial letters need to be used only if the species name refers to the taxonomic category. When the name refers to viral objects such as virions present in a preparation or seen in an electron micrograph, italics and capitals initial letters are not needed and the names are written in lower case Roman script. This also applies when the names are used in adjectival form, for instance tobacco mosaic virus polymerase. The use of italics when referring to the name of a species as a taxonomic entity signals that it has the status of an officially recognized species. The 7th ICTV Report (Van Regenmortel, M.H.V. *et al.*, 1999, Academic Press) should be consulted to ascertain which names have been approved as official species names. When the taxonomic status of a new putative species is uncertain or its position within an established genus has not been clarified, it is considered a tentative species and its name is not written in italics although its initial letter is capitalized.

TEXT:

It is essential that authors whose "first" language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English prior to submission. Authors may use either English or American style; for the former, consult the Oxford Shorter Dictionary; for the latter, consult Merriam-Webster's. Manuscripts reporting the

results of experimental investigations on human subjects must include a statement to the effect that procedures had received official institutional and ethical approval. Refer to patients by number (or, in anecdotal reports, by anonymous initials). The pronouns "we" and "our" should not be used. Split-infinitives should be avoided. Full names or identifiable designations should not be used in the text, tables, or illustrations. All measurements are to be in metric units. Avoid excessive use of acronyms and do not use unusual abbreviations. Species names should be in italics and have the first letter of the first word capitalized. All other words in the name should not be capitalized unless they are proper nouns or parts of nouns. Place acknowledgements as the last element of the text, before references.

REFERENCES:

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article: King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts. For more information about AMA reference style - [AMA Manual of Style](#)

LEGENDS. A descriptive legend must accompany each illustration and must define all abbreviations used therein.

TABLES. Each table must have a title. They should be numbered in order of appearance with Roman numerals and be keyed into the text.

ILLUSTRATIONS. To ensure highest print quality, your figures must be submitted in TIF format according to the following minimum resolutions:

1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)

300 dpi for halftones (black and white photographs)

600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

COLOR ART. In addition to the above resolution guidelines, color art must be submitted in CMYK color space. Do not submit color figures in RGB. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print.

UNACCEPTABLE FORMATS. Do not submit figures in the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PPT, PDF, XLS, DOC, BMP, 123 (or other Lotus formats).

ALL MANUSCRIPTS submitted to the Journal of Medical Virology must be submitted solely to this journal, may not have been published in any part, language, or form in another publication of any type, professional or lay, and becomes the property of the publisher. The publisher reserves copyright, and no published material may be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. The journal will not be responsible for the loss of manuscripts at any time. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors who will assist the editors by reviewing proofs before publication. Reprint order forms will be sent with page proofs. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

Disclosure of Conflicts of Interest. Authors must disclose in the manuscript any financial or other conflict of interest that might be construed to influence the contents of the manuscript, including the results or interpretation of publication. All sources of financial support for the study must be disclosed and acknowledged.

Experimental Ethics. In cases where a study involves the use of live animals or human subjects, authors must include in the appropriate section of the manuscript a statement that all experiments were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki. The institutional committees that have approved the experiments must be named.

Authors must also include a statement that **informed consent** was obtained for any experimentation with human subjects including human volunteers.

Such statements should be repeated in the text of the article under the “Materials and Methods” or “Patients and Methods” section.

(This experimental ethics policy has been informed by and adapted from the ethical guidelines authored by EuCheMS-the European Association for Chemical and Molecular Sciences. For more information,

see <http://www.euchems.org/Publications/index.asp>.)

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and

Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

ONLINE OPEN. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.