CRISTIANE DE CAMPOS CENTRONE

Detecção de DNA de HPV no plasma para potencial identificação precoce de recidiva de câncer do colo do útero.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2015

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Centrone, Cristiane de Campos
Detecção de DNA de HPV no plasma para potencial identificação precoce de recidiva de câncer do colo do útero / Cristiane de Campos Centrone. – São Paulo, 2015.
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: José Eduardo Levi

Descritores: 1. HPV. 2. PLASMA. 3. RECIDIVA. 4. MARCADOR MOLECULAR. 5. NEOPLASIAS DO COLO UTERINO. 6. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE.

USP/IMTSP/BIB-06/2015.

Aos meus pais, Antonio e Ana, por todo amor, carinho, educação dada e dedicação, por apoiarem sempre as minhas decisões e por acreditarem sempre na minha vitória. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Priscila e Larissa, pela amizade, compreensão e apoio.

Aos meus tios, tio Zézão e tia Maria Ana, pelo amor que têm por mim e primos, Dani, Tati e Ari.

Aos amigos que estiveram presentes em cada desafio e em cada sucesso.

Dedico, em especial, a todas as pacientes que contribuíram para que esse estudo fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todas as bênçãos presentes na minha vida e pela família maravilhosa que tenho e que SEMPRE me apoia e acredita nos meus sonhos.

Ao Dr. José Eduardo Levi, meu orientador e professor, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de realizar este trabalho tão importante e de colaborar em outros projetos, pela sua atenção, orientação, ensino, disponibilidade e por servir de exemplo como pesquisador dedicado nos incentivando a buscar o conhecimento e nos aprimorarmos profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Cláudio Sergio Pannuti, por me receber carinhosamente neste laboratório, pela confiança e por aceitar ser meu orientador de iniciação científica para conclusão da graduação. Admiro seu exemplo de dedicação à pesquisa.

À Dra. Clarisse Martins Machado, Lucy Santos Vilas Boas e Ana Carolina Mamana Fernandes de Souza, pela orientação, carinho, atenção e confiança depositada em mim, em meu Programa de Aprimoramento Profissional, realizado no Laboratório de Virologia do IMT.

À co-orientadora, querida amiga e irmã, Dra. Cristina Mendes de Oliveira, pesquisadora que admiro muito, por me dar a oportunidade de realizar este trabalho, pela contribuição ao meu crescimento profissional, por estar sempre pronta a me ajudar no desenvolvimento do estudo, pelos ensinamentos, dedicação, auxílio e sugestões que foram essenciais para que eu pudesse realizá-lo. Muito obrigada pela sua amizade!

À epidemiologista Dra. Rossana V. Mendoza López, pela disponibilidade sempre que precisei e importantíssima colaboração nas análises estatísticas deste estudo.

Aos meus pais, Ana e Antonio, pessoas que admiro muito e pelos quais tenho amor incondicional. Às minhas irmãs, Priscila e Larissa, por sempre acreditarem no meu potencial. Muito obrigada pelo amor, carinho, apoio, compreensão e educação necessários para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje e por serem os responsáveis por eu chegar onde cheguei. Amo vocês!

Aos meus tios, Tia Maria Ana e Tio Zé, por todo o amor e carinho que sempre me deram, por cuidarem de mim como verdadeiros pais, por serem essenciais durante a minha graduação e por acreditarem na minha vitória. Amo vocês!

Aos meus primos, Danilo, Tati, Arianne, Alê e Lucca, por serem meu porto seguro durante os anos em que morei em Botucatu e pelo amor eterno.

Ao meu namorado e amigo, Paulo Dominguez Nasser, por todo carinho, companheirismo, amor, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis que passei e por me dar forças para não desisitir.

À Dra. Maria Cristina Domingues da Silva Fink, pela pessoa encantadora e simples que é, por me receber com muito carinho no Laboratório de Virologia do IMTSP e por me dar a oportunidade de concluir minha graduação e aprender muito.

Ao meu "quarteto fantástico", Rodrigo Pessoa (homenzinho), Clara Felix, Renata Romão e Michele Padovan pelos maravilhosos anos juntos, sofredores, momentos de risada, viagens, baladas e por tornarem meus dias no laboratório sempre muito felizes.

Aos queridos amigos, Paulo Roberto Palma Urbano e Luiz Henrique da Silva Nali, companheiros de pós-graduação, de vitórias e conquistas profissionais.

Às queridas amigas de aprimoramento, Silvinha Imura, Tatiana Mitiko e Wanessa Cardoso, pela sua amizade, gostoso convívio na sala de antigenemia, pelas risadas e também pelos momentos de desabafo.

Aos amigos da "antigenemia", Marli, Wilton, Silvia e Tânia Regina por todo o carinho.

À Laura Sumita e Cynthia Canto pelo carinho e pela amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Virologia do IMT, Camila Romano e Sabri Sanabani pelo gostoso convívio durante meus anos no IMT.

Aos amigos estagiários e pós-graduandos Toni Martins, Marcelo Geraldi, Renato Oliveira, Jaila Borges, Alessandra, Célia Luiza, Danielly da Silva, Felipe Salvador, Thiago Santiago (Thiaguim), Ariane Falconi, Rodrigo Zerbinati e Adriana Tateno.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, pela importância da sua colaboração, Luciano, Sônia, Débora Alves, Maria e Georgina.

Ao meu melhor amigo, Alexandre Lins, por estar sempre presente, pela sua amizade verdadeira, pelo carinho, confiança e por dividir momentos de alegria, tristeza e vitórias. Você é muito especial!

À minha querida amiga de graduação na UNESP-Botucatu, Danielle Ferreira (Xuxalenha), pelos melhores anos da minha vida na gloriosa cidade do Saci – Botucatu - e na difícil jornada da pós-graduação em São Paulo. Obrigada por fazer parte dessa fase tão especial e continuar a dividir comigo as angústias de ser um pós-graduando!

Às minhas amigas-irmãs de infância do Colégio São José-Santos, Natália Moura, Ellen Karagiannis, Monique Rodrigues, Ingrid Devezas, Carolina Brambila, vocês fazem parte da minha história, vibram com as minhas conquistas e são meu porto seguro. Amo vocês demais!

Aos médicos do ICESP pela valiosa contribuição, em especial à Dra. Maria Luiza Nogueira Dias Genta, e às técnicas de enfermagem por estarem sempre prontas a me ajudar nas coletas de sangue e por tornar as longas esperas mais divertidas.

Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, do Hospital de Câncer de Barretos pela colaboração na coleta das amostras para este projeto, à coordenadora de projetos do HCB Talita Nascimento, Vânia Mariano e Ana Carolina de Carvalho por ajudarem no envio das amostras e coleta das informçãos clínicas das pacientes de Barretos.

Ao grupo do HPV INCT pelo financiamento do projeto, pelas reuniões sempre muito agradáveis e bastante construtivas, pela amizade, trocas de conhecimento sobre HPV e por tornar possível a minha participação no 29th International Papillomavirus Conference – Seattle – 2014.

Às companheiras e amigas de trabalho do SZD, Beatriz, Ariane, Luana, Vanessa, Silvana, Alline, Priscilla, Mari, Viviane e Dra. Fernanda Milanezi pela força, apoio, compreensão nos momentos em que mais precisei e por contribuírem com o meu crescimento profissional.

A todas as pacientes deste estudo, que mesmo estando em uma condição e momento difíceis da vida, aceitaram participar deste estudo, pela sua indispensável contribuição.

À **FAPESP 2008/57889-1 e CNPq 573799/2008-***, pelo financiamento e pela concessão da bolsa de Mestrado que tornaram possível a realização deste trabalho.*

RESUMO

Centrone CC. Detecção de DNA de HPV no plasma para potencial identificação precoce de recidiva de câncer no colo do útero [dissertação]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2015.

O câncer do colo do útero constitui a terceira neoplasia maligna mais comum na população feminina, com aproximadamente 520 mil novos casos e 260 mil óbitos por ano e origina-se a partir da infecção genital persistente pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) oncogênico. Os principais HPVs considerados de alto risco oncogênico são os tipos HPV-16 e 18, responsáveis por cerca de 70% de todos os casos de cânceres cervicais (CC) no mundo. Pacientes com CC apresentam taxa de recidiva variando de 8% a 49%. Dentro de dois anos de seguimento, 62% a 89% das recidivas são detectadas. Atualmente, os testes usados para detecção de recidiva são a citopatologia da cúpula vaginal e exames de imagem, porém ainda não estão disponíveis testes específicos. O DNA livre-circulante (cf-DNA) representa um biomarcador não-invasivo facilmente obtido no plasma e soro. Vários estudos mostram ser possível detectar e quantificar ácidos nucléicos no plasma de pacientes com câncer e que as alterações no cfDNA potencialmente refletem mudanças que ocorrem durante a tumorigênese. Essa ferramenta diagnóstica não-invasiva pode ser útil no rastreio, prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento do câncer. Portanto, o desenvolvimento e a padronização de testes laboratoriais não invasivos capazes de identificar marcadores tumorais e diagnosticar precocemente a recidiva da doença aumentam a chance de cura através da utilização dos tratamentos preconizados. Sendo assim, este estudo tem o objetivo de detectar o DNA de HPV no plasma de pacientes com CC para avaliar sua potencial utilidade como marcador precoce de recidiva. Um fragmento de tumor e sangue de pacientes com CC, atendidas no ICESP e HC de Barretos, foram coletados antes do tratamento. Entraram no estudo 137 pacientes nas quais o tumor foi positivo para HPV-16 ou 18, sendo 120 amostras positivas para HPV-16 (87,6%), 12 positivas para HPV-18 (8,8%) e cinco positivas para HPV-16 e 18 (3,6%). A média de idade das pacientes deste estudo foi de 52,5 anos. Plasma de 131 pacientes com CC da data do diagnóstico e de 110 pacientes do seguimento foram submetidas ao PCR em Tempo Real HPV tipo específico. A presença do DNA de HPV no plasma pré-tratamento foi observada em 58,8% (77/131) com carga viral variando de 204 cópias/mL a 2.500.000 cópias/mL. A positividade de DNA no plasma pré-tratamento aumentou com o estadio clínico do tumor: I – 45,2%, II – 52,5%, III – 80,0% e IV – 76,9%, (p=0,0189). A presença do DNA de HPV no plasma pós-tratamento foi observada em 27,3% (30/110). A média de tempo das recidivas foi de 3,1 anos (2,7 – 3,5 anos). O DNA de HPV foi positivo até 460 dias antes do diagnóstico clínico da recidiva. As pacientes com DNA de HPV

no plasma apresentaram pior prognóstico, tanto sobrevida como o tempo livre de doença, em relação às que foram negativas. Nas pacientes com CC a presença de HPV no plasma de seguimento pode ser um marcador precoce útil para o monitoramento da resposta terapêutica e detecção de pacientes com risco aumentado de recidiva e progressão da doença.

Descritores: HPV. Plasma. Recidiva. Marcador molecular. Neoplasias do colo uterino. Reação em cadeia por polimerase.

ABSTRACT

Centrone CC. Detection of HPV DNA in plasma samples as a potencial early marker of cervical cancer recurrence [dissertation]. Sao Paulo: Institute of Tropical Medicine of São Paulo University of São Paulo; 2015

Cervical cancer (CC) is the third most common malignancy in the female population, with approximately 520,000 new cases and 260,000 deaths per year. It is caused by a persistent genital infection with oncogenic Human Papillomavirus (HPV). The HPV-16 and 18 types are considered of high risk and account for about 70% of all cases in the world. Patients with CC have a relapse rate ranging from 8% to 49%. Within two years of follow up, 62% to 89% of relapses are detected. Nowadays, the tests used to detect recurrence are cytopathology from the vaginal vault and imaging tests, but there are no available specific tests yet. The cell-free circulating DNA (cf-DNA) is a non-invasive biomarker easily obtained from plasma and serum. Several studies have shown the possibility to detect and quantify nucleic acids in the plasma of cancer patients and that the changes in cf-DNA potentially reflect the changes that occur during tumorigenesis. This non-invasive diagnostic tool may be useful in screening, prognosis and monitoring response to treatment. Therefore, the development and standardization of non-invasive laboratory tests that are able to identify tumour markers and to make early diagnosis of the disease recurrence increase the chance of cure by appropriate treatments. Accordingly, this study aims to detect HPV DNA in the plasma of patients with CC to assess its potential utility as an early marker of recurrence. A tumour biopsy and blood of patients with CC, attended in ICESP and HC Barretos, were collected before treatment. 137 patients entered the study tumour being positive for HPV-16 or 18, 120 samples positive for HPV-16 (87.6%), 12 positive for HPV-18 (8.8%) and five positive for HPV -16 and 18 (3.6%). The average age of patients in this study was 52.5 years old. Plasma from patients with CC, 131 from the date of diagnosis and 110 from follow-up of were subjected to Real-Time PCR HPV type-specific. The presence of HPV DNA in plasma pre-treatment was observed in 58.8% (77/131) with viral load ranging from 204 copies / ml to 2,500,000 copies / mL. The DNA positivity in the pre-treatment plasma increased with advancing clinical tumour stage: I - 45.2%, II - 52.5%, III - 80.0% IV - 76.9%, ($p = 0.0189$). The presence of HPV DNA in the post-treatment plasma was observed in 27.3% (30/110). The average time of relapse was 3.1 years (2.7 to 3.5 years). HPV DNA was positive for up to 460 days before clinical diagnosis of recurrence. Considering survival and remission analysis, the patients who had the presence of HPV DNA in plasma had a worse prognosis compared to those who were negative. The overall survival and remission interval showed a significant association between the presence of HPV DNA in plasma and recurrence of the disease, indicating that in patients with CC HPV DNA in the plasma can be a useful early marker for monitoring and detection of the therapeutic response of patients at increased risk of relapse and progression of the disease.

Descriptors: HPV. Plasma. Recurrence. Molecular marker. Cervical neoplasms. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização geral do genoma do HPV. 25

Figura 2. Ciclo de vida do Papilomavírus Humano (HPV). 27

Figura 3. Progressão ao câncer cervical mediada pelo HPV. 33

Figura 4. Mecanismos de liberação de ácidos nucléicos no sangue e suas diferentes formas circulantes. 51

Figura 5. Origem dos ácidos nucléicos no sangue (cfDNA) por necrose ou apoptose, variabilidade no tamanho dos fragmentos e alterações genéticas associadas ao tumor. 52

Figura 6. Alinhamento do primer Forward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-18 com sequências de HPV-18 do GenBank. 78

Figura 7. Alinhamento do primer Forward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank. 78

Figura 8. Alinhamento do primer Forward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank. 79

Figura 9. Alinhamento do primer Forward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank. 79

Figura 10. Reta obtida através dos pontos da curva padrão da PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-16 para análise de Probit. 97

Figura 11. Reta obtida através dos pontos da curva padrão da PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-18 para análise de Probit. 97

Figura 12. Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-16 para teste de especificidade com plasma de gestantes. 98

Figura 13. Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-18 para teste de especificidade com plasma de gestantes. 99

Figura 14. Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-18 para quantificação (HeLa, pontos da curva e amostra positiva). 102

Figura 15. Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV-16 para quantificação. 102

Figura 16. Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 79). FT, final do tratamento; R, recidiva.....122

Figura 17. Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 98). FT, final do tratamento. R, recidiva; O, óbito. 123

Figura 18. Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 128). FT, final do tratamento; R, recidiva.....123

Figura 19. Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou persistência da doença durante tratamento primário (Caso 135). FT, final do tratamento; R, recidiva; O, óbtio. 124

Figura 20. Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou remissão completa da doença após o tratamento primário (Caso 83). FT, final do tratamento.....124

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Probabilidade de sobrevida acumulada X tempo de sobrevida global das pacientes em relação à presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.....108

Gráfico 2. Probabilidade livre de doença X tempo livre de doença das pacientes em relação à presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento. 110

Gráfico 3. Probabilidade de sobrevida acumulada X tempo de sobrevida global das pacientes em relação à presença ou ausência de DNA de HPV no plasma após o tratamento. 114

Gráfico 4. Probabilidade livre de doença X tempo livre de doença das pacientes em relação à presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pós-tratamento. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência do DNA de HPV no plasma de pacientes com câncer cervical em diferentes estudos. 57

Tabela 2. Lista de iniciadores utilizados para amplificar por PCR parte da região E7 do HPV-16 e 18. 75

Tabela 3. Lista de sondas utilizadas para amplificar por PCR em Tempo Real a região E7 do HPV-16 e 18. 77

Tabela 4. Características da população com análise de DNA no plasma pré-tratamento. 92

Tabela 5. Quantidade de amostras coletadas pré e pós-tratamento e tempo de coleta. 94

Tabela 6. Cálculo da média e mediana das cargas virais de HPV no plasma em cada coleta. 104

Tabela 7. Cálculo da média e mediana das cargas virais de HPV no plasma em cada coleta. 105

Tabela 8. Distribuição do DNA de HPV em amostras de plasma de pacientes com câncer cervical dentro das caracterítsicas clínicas e histopatológicas das 137 pacientes estudadas. 106

Tabela 9. Distribuição do número de pacientes que foram a óbito em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento. 107

Tabela 10. Distribuição do número de pacientes que tiveram recidiva ou persistência da doença em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento. 109

Tabela 11. Quantidade de amostras de pacientes negativas no pós-tratamento...111

Tabela 12. Quantidade de amostras de pacientes positivas no pós-tratamento....111

Tabela 13. Correlação entre presença de DNA de HPV no plasma pré e pós-tratamento... 111

Tabela 14. Distribuição do número de pacientes que foram a óbito em relação à presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento. 113

Tabela 15. Distribuição do número de pacientes que entraram para a análise do tempo livre de doença em relação à presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento. 115

Tabela 16. Correlação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.....118

Tabela 17. Correlação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento... 119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC – Adenocarcinoma

CEC – Carcinoma de células escamosas

FIGO – *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

HPV – Papiloma Vírus Humano

HCV – Vírus da Hepatite C

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ICO – Instituto Catalão de Oncologia

PCR – Reação de polimerase em cadeia

qPCR – PCR em tempo real / PCR quantitativo

pb – Pares de base

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucléico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

USP – Universidade de São Paulo

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

KCl – Cloreto de potássio

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

LSIL – Lesão intraepitelial de baixo grau

HSIL – Lesão intraepitelial de alto grau

CIS – Carcinoma *in situ*

p53 – gene supressor tumoral

pRb – gene do Retinoblastoma

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

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism,* Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição.

mRNA – RNA mensageiro

FDA – *Food and Drug Administration*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

VPN – Valor preditivo negativo

CH – Captura Híbrida

CAF – Cirurgia de alta frequência

cf-DNA – DNA livre-circulante, *cell-free DNA, cell-free nucleic acid*

ccf-DNA – DNA circulante livre de célula, *circulating cell-free DNA*

RhD – antígeno eritrocitário D

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único, *Single-nucleotide polymorphism*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

MGB – *Minor groove binder*

Tm – Temperatura de *melting*

STM – *Standard Transport Medium*

LIM – Laboratório de Investigação Médica

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

HCB – Hospital de Câncer de Barretos

INCT-HPV - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano.

Ct – *Cycle threshold*

DMSO – *Dimethyl sulfoxide,* Dimetil sulfóxido

Cols - colaboradores

OMS- Organização Mundial da Saúde

ORF- *Open reading frame*

LCR- *Long control region*, Região regulatória

LISTA DE SÍMBOLOS

μM – Micromolar
ng - Nanograma
mL – Mililitro
μL - Microlitro
°C – graus Celsius
xg – x vezes a força gravitacional
μm - micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

1.1 Papilomavírus Humano.....24

1.2 Replicação viral 26

1.3 Epidemiologia do HPV. 27

1.4 Taxonomia do HPV.....30

1.5 HPV e Câncer Humano. 31

1.6 História natural da infecção pelo HPV.....32

1.7 Diagnóstico do HPV e do Câncer do Colo Uterino 34

1.7.1 Testes para detecção do Àcido Nucléico Viral 36

1.8 Medidas preventivas do câncer do colo do útero 38

1.9 Tratamento do câncer do colo do útero.....40

1.10 Recidivas do câncer cervical após tratamento primário 41

1.11 Testes para detecção de recidivas e monitoramento da resposta ao tratamento 45

1.12 DNA livre-circulante (cf-DNA) 48

1.12.1 Influência de fatores pré-analíticos sobre a análise de cfDNA.....61

2. JUSTIFICATIVA.....67

3. OBJETIVOS 68

3.1 Objetivo Geral.....68

3.2 Objetivos Específicos.....68

4. MÉTODOS 69

4.1 Modelo do estudo 69

4.2 População do estudo e casuística.....69

4.3 Aspectos éticos.....71

4.4 Coleta das amostras.....71

4.4.1 Tumor 71

4.4.2 Plasma.....72

4.4.3 Extração de ácido nucléico do tumor 72

4.4.4 Genotipagem do HPV do tumor 73

4.4.4.1 PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frikenhausen, Germany) 73

4.4.4.2 Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA) 74

4.4.4.3 PCR HPV tipo-específico 74

4.4.4.3.1 Detecção do produto de PCR 76

4.5 Padronização da reação de PCR em tempo real para detecção de HPV-16 e do HPV-18 76

4.5.1 Determinação da temperatura de anelamento dos iniciadores.....80

4.5.2 Adequação à reação de PCR em tempo real TaqMan® 81

4.5.3 Determinação da concentração final das sondas 82

4.5.4 Determinação da sensibilidade analítica 83

4.5.5 Determinação da especificidade analítica 84

4.6 Detecção e quantificação de HPV-16 e HPV-18 nas amostras de plasma de mulheres com câncer do colo do útero e pós-tratamento.....84

4.6.1 Preparo das amostras pré-extração de ácido nucléico.....84

4.6.2 Extração de ácidos nucléicos.....85

4.6.3 PCR em Tempo Real das amostras de plasma 86

4.7 Análise dos resultados.....86

5. RESULTADOS 88

5.1 População estudada 88

5.2 Determinação final do genótipo do HPV presente no tecido tumoral.....88

5.3 Características da população na análise pré-tratamento 90

5.4 Caraterísticas da população na análise pós-tratamento..... 93

5.5 Padronização da reação de PCR em tempo real para detecção de HPV-16 e HPV-18 no plasma.....95

5.5.1 Determinação da sensibilidade analítica 96

5.5.2 Determinação da especificidade analítica 98

5.5.2.1 Plasma de gestantes 98

5.5.2.2 DNA de HPV extraído de tumor 99

5.6 Determinação e quantificação de HPV-16 e HPV-18 no plasma de mulheres com câncer no colo do útero.....101

5.6.1 Análise de DNA de HPV no plasma pré-tratamento 103

5.6.2 Análise de DNA de HPV no plasma pós-tratamento 110

5.6.3 Recidivas e persistência da doença.....116

6. DISCUSSÂO 125

7. CONCLUSÃO.....140

REFERÊNCIAS 142

ANEXO A – Alinhamento da região E7 de HPV-16 155

ANEXO B – TCLE HC-FMUSP 157

ANEXO C – Participação em artigo 162

ANEXO D – Apresentação de pôster.....163

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos vários programas de rastreamento implantados em todo o mundo a partir de 1950, o câncer do colo do útero ainda constitui globalmente a terceira neoplasia maligna mais comum na população feminina no mundo, com aproximadamente 520 mil novos casos e 260 mil óbitos por ano[1, 2].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê crescimento de 45% na taxa de mortalidade por essa neoplasia no período compreendido entre 2007 e 2030 (de 11.3 milhões para 15.5 milhões de óbitos), com maior incidência nos países em desenvolvimento[3].

O dado mais recente para o Brasil foi publicado na “Estimativa 2016 - Incidência de Câncer”, disponível no site do INCA, onde foram estimados cerca de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero para o ano de 2016, com incidência estimada de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na região Norte (23,97 casos/100 mil mulheres)[4].

Virtualmente todos os casos de câncer do colo do útero estão relacionados à infecção genital persistente pelo Papiloma Vírus Humano oncogênico (HPV). Conhecendo-se a história natural da infecção por este vírus e os processos necessários para que uma lesão precursora progrida a um câncer, o diagnóstico precoce de lesões precursoras torna possível sua prevenção e cura[5].

Apesar dos tratamentos disponíveis para o câncer do colo do útero apresentarem taxas de cura de aproximadamente 80% a 90% em pacientes diagnosticadas em estadios precoces da doença e aproximadamente 60% em pacientes com estadios mais avançados, uma parcela dessas mulheres pode apresentar recidiva da doença após o tratamento primário[6, 7].

Desde a descoberta de DNA livre de células (cf-DNA) no soro e plasma de pacientes com câncer, um novo campo de pesquisa em marcadores de tumor como ferramenta de diagnóstico e monitoramento da resposta ao tratamento tem emergido[8-10]. Como o DNA de HPV encontra-se tanto inserido no DNA das células tumorais como presente na forma circular, ele pode servir como um marcador genético no câncer cervical e assim alguns trabalhos buscaram verificar se a presença de DNA de HPV na circulação de pacientes com câncer cervical possui algum valor diagnóstico e prognóstico[11, 12].

1.1 Papilomavírus Humano

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*[13].

A partícula viral mede aproximadamente 55 nm de diâmetro e não possui envoltório, característica essa que o torna estável e resistente aos solventes orgânicos e aquecimento. Permanece viável por pelo menos uma semana em meio extracelular[14].

O genoma do HPV é composto por uma molécula de DNA fita dupla circular com aproximadamente 8.000 pb, contido no capsídeo formado por 72 capsômeros, apresentando simetria icosaédrica[13].

Uma característica genômica dos HPVs é que todas as ORFs (open reading frame), cerca de dez, localizam-se na mesma fita de DNA e são divididas em inicial (E - early) e tardia (L – late). Além dessas regiões, há uma denominada regulatória (LCR – long control region), que não possui ORFs e pode variar de 500 a 1.000pb[13, 14] (Figura 1).

A região E codifica as proteínas envolvidas no processo de replicação viral e transformação celular que são expressas nos estágios precoce e tardio da infecção

(E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8). A região L é responsável pela montagem do vírion, codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2) e é expressa somente em células com infecção produtiva. A região LCR é onde se encontram a origem da replicação, os elementos regulatórios da transcrição e da replicação viral[13].

As proteínas precoces E1 e E2 estão envolvidas na replicação do DNA viral e transcrição de RNA viral, E4 está envolvida na reorganização do citoesqueleto e E5, E6 e E7 são responsáveis pela transformação celular e imortalização[15].

A proteína E2 é um fator de transcrição que atua como um ativador ou repressor da atividade transcricional de todos os genes do HPV, além de interagir com a proteína E1 para replicação do DNA viral e manutenção da forma episssomal do vírus. E2 também é uma proteína reguladora importante para o estabelecimento da infecção e vital para o ciclo de vida completo do vírus. Mas por outro lado, uma quebra no gene E2 quando o DNA viral se insere no genoma da célula hospedeira é associada com a progressão maligna do câncer cervical HPV positivo pela perda do controle sobre os oncogenes E6 e E7[15].

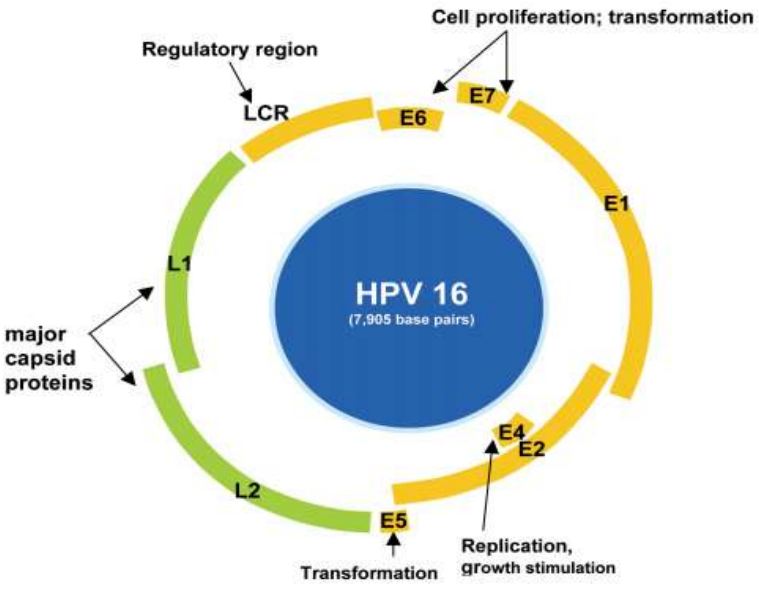


Figura 1 – Organização geral do genoma do HPV.
Fonte: Villa LL, 2006[16]

1.2 Replicação viral

O HPV possui tropismo por células do epitélio escamoso. No entanto, o receptor utilizado para a entrada do vírus na célula ainda é desconhecido[13]. Após a entrada do vírus na célula ocorre o transporte de partículas virais para o núcleo celular[13], onde tem início a replicação viral com a remoção das histonas associadas ao DNA viral e seu desenrolamento[17]. A proteína E1 se liga às proteínas de replicação celulares e a replicação do DNA progride bidirecionalmente a partir de ori localizada em LCR[13]. O DNA é envolto pelo capsídeo e a partícula viral é liberada da célula por um processo passivo, não citolítico[13].

A infecção inicial pelo HPV ocorre provavelmente nas *stem cells* da camada basal do epitélio cervical estratificado ou dos folículos pilosos da pele, através de microlesões. Então, o genoma do HPV permanece na forma episssomal no núcleo das células infectadas. O ciclo de vida viral é estritamente controlado pela diferenciação da célula hospedeira e o ciclo produtivo (tardio) ocorre nas camadas superiores do epitélio que são totalmente diferenciadas, e então os vírions formados são liberados dos queratinócitos do estrato córneo[14, 18] (Figura 2).

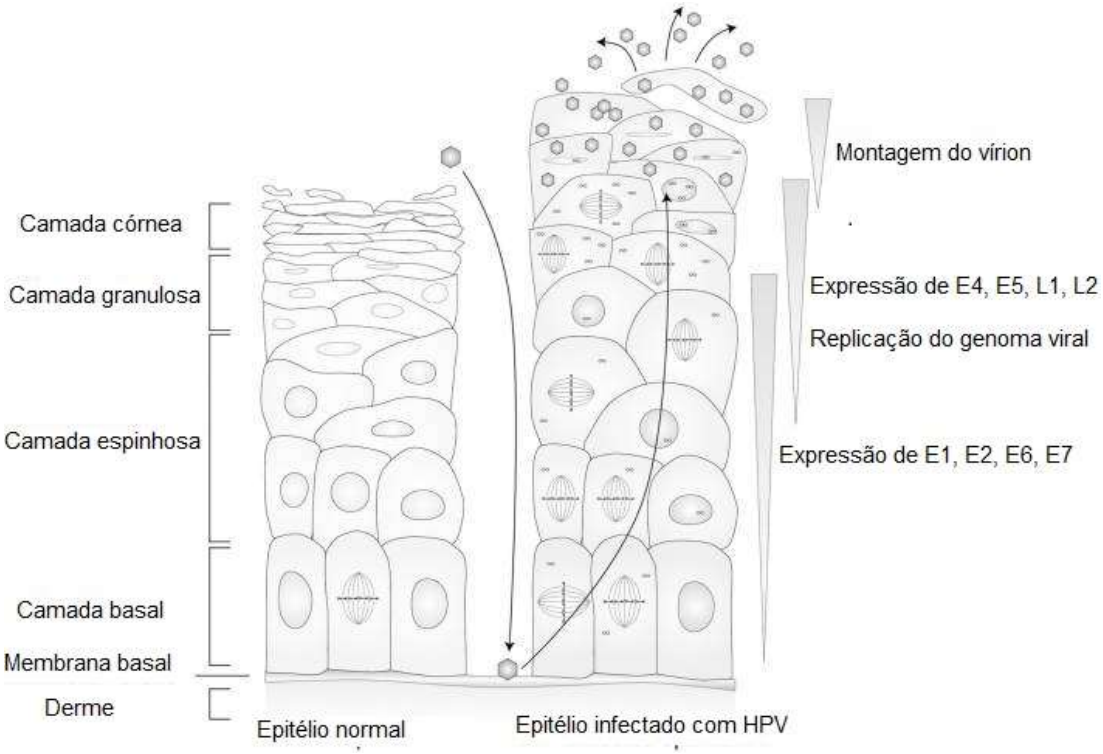


Figura 2 – Ciclo de vida do Papilomavírus Humano (HPV).
Fonte: Kajitani N et al., 2012[18]

1.3. Epidemiologia do HPV

A infecção genital pelo HPV é transmitida por contato sexual e está relacionada ao início precoce da atividade sexual, ao número de parceiros e ao comportamento sexual[14]. A infecção pelo HPV em mulheres já está bem estabelecida como a principal causa de câncer cervical e está aumentando a evidência do papel relevante deste vírus em outros cânceres anogenitais (ânus, vulva, vagina e pênis) e cânceres de cabeça e pescoço[19].

A infecção pelo HPV pode causar proliferação celular local, que se torna aparente na forma de tumores benignos como as verrugas, condilomas e neoplasia intraepitelial cervical. A maioria das lesões de caráter benigno (LSILs e NICs 1) pode regredir espontaneamente em pacientes imunocompetentes. No caso dos

HPVs de alto risco oncogênico, a infecção persistente confere grande risco de progressão de lesões pré-malignas para carcinoma *in situ* e invasivo[14].

Em todas as regiões do mundo, a prevalência da infecção pelo HPV é mais alta em mulheres com menos de 34 anos de idade, diminuindo no grupo dos 35 a 44 anos. Um aumento na prevalência é encontrado, em algumas regiões, na faixa etária dos 45 aos 54 anos quando a incidência de câncer cervical é mais alta[20].

A prevalência média de infecção pelo HPV em mulheres com resultado de teste citológico normal é 10%, sendo que a região da África oriental apresenta as maiores taxas com 31,6% e o sudeste da Ásia a menor, com 6,2%, seguido pelo sul da Europa com 6,8%[20].

No Brasil, as taxas de prevalência da infecção genital pelo HPV em mulheres variam de 6,7% a 89%, de acordo com a população estudada e o tipo de anomalias encontradas no teste citológico[21-30].

Estimativas atuais indicam que a cada ano cerca de 493.243 mulheres são diagnosticadas com câncer cervical e 273.505 morrem desta doença no mundo, principalmente em países em desenvolvimento como nas regiões mais pobres do sul da Ásia, África-subsaariana e partes da América Latina[19].

Segundo estimativas do ICO *HPV Information Centre* para o ano de 2012, o câncer cervical ocupa a quarta posição entre as causas de morte por câncer femino e foi o responsável pelo óbito de cerca de 265 mil mulheres no ano de 2012, sendo que cerca de 81% dos casos de morte ocorreram em países em desenvolvimento, nos quais este tipo de câncer apresenta-se como o segundo tipo mais frequente nas mulheres[1].

Baseando-se nos índices atuais e assumindo que as taxas de incidência/mortalidade serão constantes ao longo do tempo, foi possível fazer uma projeção para o ano de 2025 com números duas vezes maiores que os atuais para países em desenvolvimento[19].

Atualmente, a IARC (Agência Internacional para Pesquisa de Câncer) divide os HPVs em de baixo risco oncogênico (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) e de alto risco oncogênico (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) de acordo com a sua capacidade de gerar neoplasias malignas[14]. Os tipos HPV-26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82 são classificados como genótipos de provável alto risco[14, 31, 32].

Segundo o estudo publicado pelo Instituto Catalão de Oncologia junto com a Organização Mundial da Saúde (ICO HPV information centre for ICC/WHO), a prevalência da infecção cervical pelos HPVs -16 e/ou 18 no Brasil de acordo com o tipo de lesão são: citologia normal – 4,3%, lesão cervical de baixo grau (LSIL/NIC I) – 34,7%, lesão de alto grau (HSIL/NIC II/NIC III/ CIS) – 54,0% e carcinoma cervical invasivo – 70,7%[19].

Os HPVs de baixo risco oncogênico estão relacionados com condilomas, verrugas de pele, papilomas e lesão escamosa intraepitelial de baixo grau, enquanto os de alto risco oncogênico são associados ao câncer cervical[14]. Apesar dessa relação entre tipos de HPV e patologias estarem bem estabelecidas e estudadas, pesquisas recentes mostram que HPVs de baixo risco, como o HPV 11 e o 6, já foram os únicos tipos isolados de biópsias de câncer cervical[33-35]. Em relação ao oposto, HPV de alto risco presente em lesões de baixo grau também foi descrito[36-38].

Oliveira et al.[33] encontraram a presença apenas de HPV 11 no tumor primário de colo do útero e na metástase de linfonodo de uma mulher de 38 anos infectada pelo vírus HIV. O mecanismo de carcinogênese deste tipo de HPV tido como não-oncogênico é pouco conhecido. Neste estudo não foi encontrada a mutação na posição 31 da proteína E6 (ausência de um aminoácido básico) que geralmente ocorre em algumas espécies do gênero *Alpha-papillomavirus*, a qual

está associada à atividade de degradação de p53 e que pudesse resultar em um ganho de função similar à dos HPVs de alto risco oncogênico[33].

Sabendo-se que toda doença infecciosa e suas manifestações clínicas são resultado de interações entre agente e hospedeiro, os sintomas atípicos como os descritos acima podem ser o resultado de vários fatores intrínsecos do vírus, como isolados de HPV com atividade biológica anormal, associados a características dependentes do hospedeiro, como estado imunológico. Estudos comparativos de seqüenciamento completo do vírus presente em infecções atípicas e comuns podem ajudar a elucidar essas manifestações raras[39].

1.4 Taxonomia do HPV

A classificação dos papilomavírus (PVs) é complexa e baseada em análises filogenéticas. A região genômica L1 dos PVs é a mais conservada, facilitando a detecção com primers genéricos, mas também possui trechos variáveis que nos permite separar os genótipos. Por esse motivo é utilizada para a classificação.

Os PVs são classificados em gênero, espécie e tipo. Gêneros diferentes compartilham menos de 60% de identidade nas sequências nucleotídicas de L1, espécies do mesmo gênero compartilham cerca de 60% a 70% de identidade nessas sequências e os tipos pertencentes à mesma espécie compartilham cerca de 71% a 89% de identidade nas sequências nucleotídicas de L1[40].

Os principais HPVs relacionados com infecção de mucosa pertencem ao gênero *Alpha-papillomavirus*. Já foram descritos cerca de 200 tipos de Papiloma Vírus Humanos e cerca de 100 tipos tiveram o genoma completamente seqüenciado[41]. Destes, cerca de 40 tipos de HPV infectam a área genital[14]. Dentre os *Alpha-papillomavirus* temos duas importantes espécies, as quais

compreendem os principais tipos considerados de alto risco oncogênico: espécie 7 (HPV-18, 39, 45, 59, 68) e espécie 9 (HPV-16, 31, 33, 35, 52, 58, 67)[41].

1.5 HPV e Câncer Humano

Segundo estimativa do INCA, sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer cervical é o primeiro mais incidente na região Norte com 23,97 casos por 100 mil habitantes. Nas regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição mais freqüente, na região Sudeste (11,30/ 100 mil) a terceira, e na região Sul (15,17/100 mil) a quarta posição mais frequente[4].

Como já dito anteriormente, a infecção persistente por HPVs de alto risco oncogênico podem levar a progressão de lesões precursoras ao câncer. Nesse processo de carcinogênese associado ao HPV, uma cascata de eventos anormais é induzida, incluindo o rompimento do controle do ciclo celular e alteração da expressão de genes. A identificação e avaliação funcional das proteínas do hospedeiro associadas com as oncoproteínas E6 e E7 podem dar informações importantes para a compreensão do processo de carcinogênese[15, 16].

Várias funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7, dentre elas a principal é que essas proteínas estão claramente ligadas à carcinogênese[16]. Observações iniciais mostraram que a proteína E7 é capaz de ligar-se à forma subfosforilada da proteína supressora de tumor pRb, inativando-a, enquanto a E6 forma um complexo com uma proteína ligase celular (E6AP), liga-se à p53 acelerando sua degradação proteolítica, assim, prevenindo a apoptose mediada por essas proteínas e gerando instabilidade celular[5]. A oncoproteína E6 altera a diferenciação celular, tem atividade antiapoptótica, induz a expressão da

telomerase humana e interfere na função antiproliferativa do p53 como supressor tumoral, enquanto que a oncoproteína E7 reativa a proliferação celular e juntas essas duas oncoproteínas virais estimulam a progressão do ciclo celular[15].

Células epiteliais cervicais que abrigam o DNA do HPV integrado ao seu genoma apresentam maior atividade de crescimento celular relacionada ao aumento da expressão desses dois genes virais[16, 32]. A expressão continua de proteínas dos genes E6 e E7 de HPVs de alto risco podem levar ao acúmulo de mutações no genoma celular que são necessárias para transformação e imortalização celular, com consequente conversão em fenótipo maligno da célula infectada[16, 42].

1.6 História natural da infecção pelo HPV

Como já dito anteriormente, a infecção persistente por um ou mais genótipos de HPV de alto risco é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer cervical, sendo os tipos 16 e 18 os principais responsáveis por grande número de casos, porém com algumas diferenças entre regiões geográficas[43, 44].

O início da infecção epitelial pelo HPV se dá por mecanismos microabrasivos que expõem as células da camada basal, principalmente na região da junção escamocolunar da cérvix uterina, as quais passam por uma transformação de epitélio colunar a escamoso ao longo das camadas da cérvix uterina. Quando as células basais são infectadas, o genoma viral é replicado na forma episssomal e os genes precoces são expressos (E1 a E7)[15, 18] (Figura 2).

Em lesões de baixo grau, as células infectadas migram em direção ao lúmen e expressam os genes das proteínas do capsídeo L1 e L2, as quais compõem a

cápsula viral para formar vírions no núcleo. A liberação de novos vírions pode iniciar uma nova infecção ou ser transmitido sexualmente[15, 18, 45].

Em alguns casos a infecção progride para lesões de alto grau e carcinoma cervical, um processo associado com a integração do genoma do HPV no genoma da célula hospedeira, a qual está associada a perda ou quebra de E2, e subsequente aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7[15, 45] (Figura 3).

A combinação de fatores ambientais, virais e do hospedeiro juntos aumenta o risco de progressão da doença.

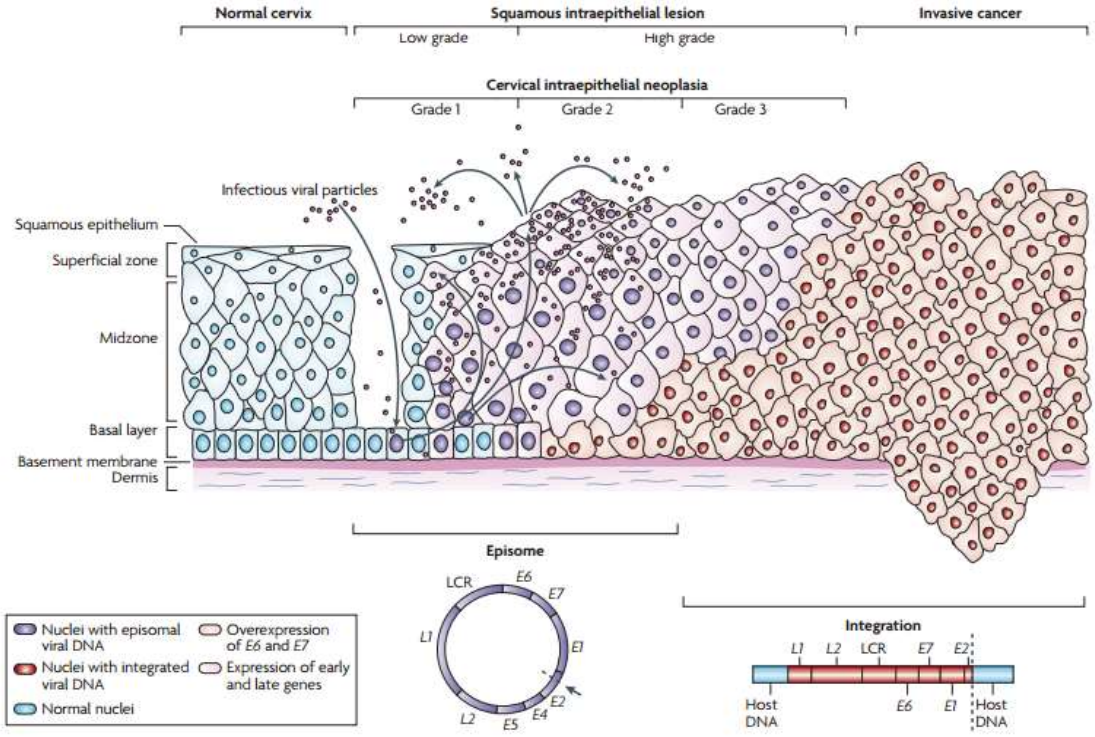


Figura 3 – Progressão ao câncer cervical mediada pelo HPV.
Fonte: Woodman et al., 2007[45]

O controle da infecção por HPV ou o desenvolvimento de neoplasia cervical depende de ambas as respostas imune inata e adaptativa. Embora na maioria dos casos a resposta imune do hospedeiro controle a infeção por HPV, os HPVs de alto risco oncogênico têm a capacidade de subverter as defesas imunes, o que explica a infecção persistente e progressão à neoplasia[16].

1.7 Diagnóstico do HPV e do Câncer do Colo Uterino

O diagnóstico da infecção pelo HPV baseia-se em exames clínicos, através da colposcopia que permite ao médico visualizar lesões no colo do útero e exames complementares com pesquisa direta do vírus (testes moleculares como PCR e Captura Híbrida® versão 2, entre outros) ou indireta, como a citologia (exame de Papanicolaou, também conhecido como preventivo ou exame citopatológico) na qual são detectadas alterações nas células e tecidos provocadas pela infecção[14, 46].

Segundo a OMS, havendo uma cobertura da população-alvo de, no mínimo, 80% associada à garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos identificados como alterados, é possível reduzir, em média, de 60% a 90% a incidência de câncer cervical invasivo[47].

Esse efeito positivo do rastreamento do câncer do colo do útero sobre a queda na incidência de casos de câncer cervical pôde ser observado em países desenvolvidos, onde o rasteamento foi implantado com qualidade, cobertura adequada, tratamento e seguimento das mulheres[14, 48]. No Brasil, a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Sáude, segundo as “Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero” é o exame citopatológico, prioritariamente em mulheres de 25 a 64 anos que já tiveram

atividade sexual, com intervalo entre os exames de três anos, após dois exames negativos com intervalo anual entre os mesmos. Nas mulheres imunossuprimidas, o exame citopatológico deve ser realizado, naquelas que já tiveram início da atividade sexual, com intervalos semestrais no primeiro ano, e se normais, manter seguimento anual[49].

Em alguns países da Europa, como Reino Unido, Itália, Suécia e Holanda estão sendo realizados estudos sobre novas estratégias de rastreio baseando-se no uso do teste molecular como teste de rastreio primário para avaliar a eficácia deste teste na prevenção do câncer cervical e observaram que o rastreio baseado em teste de HPV forneceu de 60 a 70% maior proteção contra carcinoma cervical comparado com o rastreio baseado em citologia e sugerem que o início deste rastreio com teste de HPV seja aos 30 anos e um aumento no intervalo de rastreio para 5 anos[50].

A implantação do teste de DNA de HPV no programa de rastreio brasileiro segundo as “Diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer do colo do útero”, atualmente, enfrenta grandes obstáculos já que nosso país ainda não possui programas organizados de rastreamento do câncer do colo do útero baseado em um sistema de informação longitudinal em saúde, assim como, não há controle das mulheres que realizam os exames e nem da periodicidade com que fazem. Portanto, segundo as Diretrizes, não há ferramentas que garantam que o intervalo entre os controles será efetivamente ampliado a partir da adoção do teste de HPV, condição necessária para que se tenha algum resultado de custo-efetividade favorável, além dos testes moleculares terem, atualmente, custo mais elevado que o teste citológico no Brasil[49]. Apesar disso, existem evidências na literatura que comprovam a eficácia do teste de HPV no rastreio do câncer cervical[50].

1.7.1 Testes para detecção do Ácido Nucléico Viral

Os testes que detectam o DNA do HPV são mais sensíveis que a citologia e podem determinar o tipo viral envolvido na infecção. Técnicas de Southern blotting, hibridização in situ, Captura Híbrida® versão II (hc2, Digene Corp., EUA) e reação em cadeia da polimerase (PCR) foram empregadas em estudos epidemiológicos e clínicos[32]. Estudos recentes indicam que o teste de HPV é a ferramenta de rastreio mais sensível para a detecção de NIC II e III e câncer cervical[51].

O teste de captura híbrida comercial (hc2, Digene, Inc., Quiagen, Gaithersburg, MD) é um ensaio com amplificação de sinal baseado na hibridização do DNA de HPV-alvo com sondas de RNA marcadas para a detecção qualitativa do DNA de HPVs de alto e baixo risco oncogênico em amostras cervicais[52].

A reação de PCR apresenta alta sensibilidade e permite a detecção de menos de 10 cópias de DNA de HPV em uma amostra. A reação é baseada na amplificação da seqüência alvo utilizando processo de termociclagem e *primers* tipo-específicos, desenhados para amplificar exclusivamente um único tipo de HPV, ou *primers* consenso, estes últimos permitindo amplificar seqüências de DNA de diferentes tipos porque o alvo é uma região conservada do genoma do HPV, na presença de uma DNA polimerase estável[52]. Para determinação do tipo de HPV que está causando a infecção, após realização de PCR utilizando *primers* consenso, pode-se realizar a reação de seqüenciamento genômico ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a qual é baseada na utilização de enzimas de restrição que digerem a sequência de DNA amplificado, gerando fragmentos de tamanhos diferentes que são visualizados através de eletroforese em gel de agarose[52].

Existem testes comerciais de genotipagem do HPV que detectam por hibridização do produto amplificado de PCR à sondas específicas, para HPVs de alto e baixo risco, imobilizadas em membranas de nylon como o Roche Linear Array (LA) HPV Genotyping Test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) e o INNO-LiPA® HPV genotyping assays (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium)[53]. Há também o teste de *microarray*, no qual 28 sondas de DNA fixadas em um chip ao hibridizar com o produto de PCR emitem fluorescência, a qual é captada por um laser e interpretada por um software (PapilloCheck® - Greiner Bio-One GmbH, Frickenhaunsen, Germany).

Além de testes de genotipagem baseados na identificação do DNA do HPV, há também testes disponíveis que têm como alvo o mRNA dos oncogenes E6 e E7 de HPV de alto risco oncogênico como o Aptima HPV Assay (Gen-Probe, San Diego, CA) e o NucliSENS EasyQ® HPV (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Outra importante forma de genotipagem é através de PCR em tempo real realizado com o sistema TaqMan®, sondas fluorescentes e oligonucleotídeos iniciadores tipo-específico[52].

Atualmente, existem testes comerciais disponíveis que realizam a genotipagem do HPV por PCR em Tempo Real qualitativo de forma totalmente automatizada. Dentre eles temos o cobas® 4800 HPV test (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA, Inc) e o BD Onclarity HPV Assay (BD Diagnostics, Sparks, MD), os quais realizam desde o processo de extração do DNA até a montagem da reação, amplificação e detecção do DNA-alvo através de PCR em Tempo Real. O teste BD Onclarity HPV Assay (BD Diagnostics, Sparks, MD) identifica individualmente seis genótipos de alto-risco (HPV-16, 18, 31, 45, 51 e 52) ao mesmo tempo em que detecta 14 tipos de HPV de alto risco e o cobas® 4800 HPV test (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA, Inc) identifica

individualmente os dois principais tipos de HPV de alto risco (16 e 18) enquanto detecta simultaneamente os mesmos 14 tipos de HPV de alto risco.

1.8 Medidas preventivas do câncer do colo do útero

O rastreio de lesões pré-cancerígenas associado ao tratamento precoce são medidas muito importantes para a prevenção da progressão da doença, mas a vacina para os principais tipos de HPVs de alto risco é uma alternativa que pode contribuir para a redução no número de casos de câncer cervical, lesões pré-cancerígenas de alto e baixo grau. A vacina que inclui também proteção contra os dois principais tipos de HPV de baixo risco pode evitar o desenvolvimento de verrugas genitais[44, 54].

Atualmente, estão disponíveis duas vacinas preventivas contra a infecção pelos principais tipos de HPVs com o potencial de reduzir a incidência dos cânceres cervical e anogenital: a Gardasil® (Merck&Co) e a Cervarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals). As duas vacinas são administradas em três doses a tempos determinados.

As vacinas profiláticas Gardasil® e Cervarix™ usam tecnologia recombinante e são compostas por proteínas L1 do capsídeo do HPV purificadas que, espontaneamente, se unem formando partículas semelhantes às partículas virais (VLP). Vacinas VLPs são consideradas seguras porque são constituídas por partículas não infecciosas e por não conter produtos biológicos vivos ou DNA viral. Ambas as vacinas atuam por indução da imunidade humoral e celular[54, 55].

A vacina bivalente Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgium) protege contra os dois tipos oncogênicos mais importantes – HPV 16 e 18 (responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical) e a vacina quadrivalente

Gardasil® (Merk and Co., USA), a qual além de gerar proteção contra os tipos oncogênicos 16 e 18, também protege contra dois tipos não-oncogênicos, os HPVs 6 e 11, responsáveis pelas verrugas genitais e outras lesões não-malignas[56]. A Gardasil contém sal de alumínio com adjuvante e é produzida em levedura. Cervarix contém como adjuvante ASO_4, o qual inclui lipídio monofosforil A e sal de alumínio, e é produzida em células de inseto[56].

A comercialização da vacina quadrivalente da Merck&Co, Gardasil®, foi aprovada em 2006 pela agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Em 2008, a ANVISA aprovou a comercialização da vacina bivalente Cervarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals).

No Brasil, a vacinação gratuita foi incluída no Calendário Nacional de Vacinação do SUS em março de 2014, tendo como população-alvo meninas de 11 a 13 anos de idade. No ano de 2015, a oferta da vacina foi ampliada para meninas na faixa etária de 9 a 13 anos de idade, adotando o esquema de três doses (0, 6 e 60 meses). A vacina de escolha foi a quadrivalente, Gardasil®, que protege contra os dois principais tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico (16 e 18, 6 e 11).

Vale ressaltar que a imunização não deve ser confundida com tratamento, ela só é eficaz se administrada em crianças e adolescentes que não iniciaram a atividade sexual (entre 9 e 10 anos de idade) e ela não clareia uma infecção já existente[54].

Até o momento, os esforços estão voltados para o desenvolvimento de vacinas preventivas de maior espectro, assim como para vacinas terapêuticas[41].

Outra medida preventiva alternativa para evitar a transmissão do vírus por contato entre pele/mucosa, nos casos em que a vacinação em massa não está disponível, é a circuncisão masculina e o uso de preservativos, porém este não

oferece proteção completa por não cobrir todas as áreas de tecido expostas durante a relação sexual[19, 54].

1.9 Tratamento do câncer do colo do útero

O tratamento tem por objetivo eliminar ou reduzir as lesões causadas pela infecção. O melhor método para o tratamento do câncer do colo do útero depende de cada caso em particular, de acordo com a idade da paciente, do estadio da doença, da extensão e localização da lesão[7].

O tratamento do câncer do colo uterino está baseado no estadiamento da doença. Os dois mais importantes fatores prognósticos no câncer cervical, além do estadiamento, são o tamanho do tumor e o envolvimento de linfonodos. Em alguns casos especiais, quando a mulher não tem prole constituída, condutas individuais podem ser adotadas para preservar a fertilidade[57].

O tratamento primário para câncer do colo do útero, que pode ser por cirurgia ou radioterapia, com ou sem quimioterapia sensibilizante, possui uma taxa de cura de cerca de 80% a 95% em pacientes diagnosticadas com a doença em estadio inicial (estadios I e II) e aproximadamente 60% em pacientes com estadio III da doença[6]. A histerectomia simples ou radical e linfadenectomia pélvica é o tratamento de escolha em estadios iniciais (IA1, IA2, IB1, IB2, IIA1 ou 2, IIB)[58, 59]. Nos estadios mais avançados é recomendado apenas quimioterapia ou radioterapia, ou a combinação de ambas (IIA2, III e IV)[58]. A combinação de quimioterapia + radioterapia, em comparação com a radioterapia sozinha, leva a um benefício na sobrevida geral de 8% e 9% para intervalo livre de recidiva local[57].

1.10 Recidivas do câncer cervical após tratamento primário

A recidiva do câncer cervical é um problema clínico, por não ser detectado na maioria das visitas de seguimento, o que leva a um prognóstico de sobrevida geralmente pobre. Os dados da literatura variam bastante em relação aos principais fatores que influenciam na sobrevida e valor prognóstico favorável, sendo difícil estabelecer quais são os fatores mais importantes a serem avaliados para estabelecer a conduta clínica ideal. O conceito da vigilância em longo prazo, ou seguimento das pacientes tratadas, é baseado na premissa de que a detecção precoce de uma recidiva levaria a um melhor prognóstico uma vez que os tratamentos preconizados podem ser iniciados o quanto antes, e por consequência, terem maior chance de serem efetivos diminuindo a morbidade e aumentando a sobrevida[7].

Elit et al.[7] fizeram uma revisão da literatura usando 17 artigos sobre follow-up pós-terapia em pacientes com câncer cervical e encontraram uma média de tempo de recidiva variando de 7 a 36 meses após tratamento primário, ou seja, as recidivas variam de meio ano a três anos[7].

As taxas de recidiva de 15 estudos tiveram incidência variando de 8% a 49% nos estudos revisados por Elit et al.[7]. Em seis estudos onde 90% ou mais das pacientes estudadas foram diagnosticadas com estadio precoce da doença (estadio IB), as taxas de recidiva foram mais baixas, variando de 10% a 18% das pacientes[7].

Em relação ao tempo para que as recidivas fossem detectadas, os artigos revisados por Elit et al.[7] variaram de dois a cinco anos. Em nove estudos, 62% a 89% das recidivas de câncer cervical (CC) foram detectadas no prazo de dois anos do tratamento primário. No terceiro ano de seguimento, seis estudos apresentaram

uma proporção de detecção das recidivas de CC variando de 75% a 85%. Nos seis estudos que reportaram pelo menos cinco anos de seguimento, as recidivas detectadas variaram de 89% a 99% em cinco anos de seguimento[7].

Nos 15 estudos que reportaram o status da pacientes no momento da detecção da recidiva (assintomática X sintomática), 46% a 87% eram sintomáticas e 4% a 54% eram assintomáticas[7].

Bodurka-Bevers e colaboradores[60] analisaram 993 pacientes diagnosticadas com câncer cervical estadio IB e verificaram que 13% destas pacientes desenvolveram recidiva da doença; sendo que das 461 pacientes que foram submetidas à cirurgia, 9% tiveram recidiva e das 532 que foram inicialmente submetidas à radioterapia, 17% recidivaram[60].

Yu et al.[61] encontraram uma taxa de recidiva de 9% (12/133) das pacientes tratadas por câncer cervical no perído de seguimento que durou uma média de 26,6 meses.

Zola et al.[62] analisaram retrospectivamente 327 mulheres que tiveram episódios de recorrência do câncer do colo do útero após tratamento, em oito instituições italianas, com o objetivo de verificar qual a relevância clínica do esquema de visitas agendadas no seguimento em detectar corretamente a presença de recorrência no momento da visita em relação ao *status* da paciente (sintomática ou assintomática) e observaram que o tempo médio de sobrevida, desde a detecção de recorrência em pacientes assintomáticas, foi de 109 meses versus 37 meses para as sintomáticas. Das pacientes que desenvolveram recorrência do carcinoma, 49,8% eram sintomáticas no momento da detecção de recorrência e 50,2% não apresentavam qualquer sintoma. Em relação ao intervalo médio livre de doença (tempo definido entre o tratamento primário e a primeira confirmação de detecção de recorrência) foi constatado 24 meses para pacientes assintomáticas e 36 meses para pacientes sintomáticas, no momento da detecção

da recorrência[62]. Bodurka-Bevers et al.[60] verificaram intervalo médio livre de doença em pacientes diagnosticadas com estadio IB do câncer cervical similar entre pacientes assintomáticas (16 meses) e sintomáticas (17 meses).

Sartori et al.[63] e Duyn et al.[64] não encontraram diferenças estatisticamente significantes na sobrevida de pacientes com câncer cervical entre pacientes sintomáticas e assintomáticas[63, 64]. Bodurka-Bevers et al.[60], ao contrário, verificaram que a média de sobrevida a partir da recidiva diferiu significantemente ($p<0,001$) entre pacientes assintomáticas (42 meses) e sintomáticas (11 meses).

Quando o tratamento primário envolve radiação pélvica, a distribuição de recidivas depende do estadio inicial da doença, com maior risco de doença persistente ou recidiva pélvica em pacientes com tumores mais avançados[7].

O tratamento da recidiva da doença é semelhante ao tratamento do tumor primário e vai depender de cada caso (dependendo do tratamento prévio e do local onde a recidiva foi detectada), podendo ser por cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou cuidados paliativos[64]. A radiação pode ser uma opção se não foi usada anterioromente, e cirurgia pode ser a escolha em casos previamente tratados com radio e quimioterapia[57]. A recidiva de CC é quase sempre incurável e menos de cinco por cento das pacientes que desenvolvem a recidiva estão vivas em cinco anos[6].

Segundo Zola et al.[62], o local das recidivas parece influenciar na sobrevida das pacientes, uma vez que pacientes com recidiva em cúpula vaginal viveram significantemente mais tempo do que as com recorrências em outros locais. O status sintomático ou assintomático, no momento da detecção de recidiva, é um fator preditivo significante na sobrevida, mesmo quando outros fatores prognósticos são considerados[60, 62].

Dentre os possíveis fatores prognósticos anatomoclínicos que podem ser levados em consideração na sobrevida de pacientes com carcinoma do colo

uterino, submetidas a tratamento, estão: idade, tipo histológico, grau de diferenciação, invasão do espaço linfático, vascular e perineural, metástase linfonodal, distância da margem mais próxima, profundidade de invasão do tumor, presença de necrose, maior diâmetro do tumor e comprometimento de margens cirúrgicas[59].

Tavares e cols[59] analisaram todos esses fatores prognósticos, na sobrevida de pacientes com câncer cervical submetidas à histerectomia total, citados acima, e observaram que o tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, necrose e comprometimento de margens cirúrgicas apresentaram impacto na sobrevida, enquanto que os outros não foram importantes no prognóstico. Outro importante achado foi que a presença de necrose no tumor teve influência negativa na sobrevida das pacientes[59].

Em contrapartida, Sartori et al.[63] não encontraram diferenças estatisticamente significativas em termos de local da recidiva, intervalo livre de doença e sobrevida geral após recidiva em relação à fatores prognósticos clínico-patológicos definidos no tumor primário.

Outros fatores prognósticos significantes para a sobrevida no caso de recorrência da doença encontrados por Duyn e cols[64] foram o intervalo de tempo livre de doença, uma vez que a recorrência da doença tenha sido estabelecida, e a modalidade de tratamento.

No estudo de Elit et al.[7], verificou-se que a média de sobrevida para a maioria dos pacientes variou de 7 a 17 meses após detecção de recidiva. Zola et al.[62], encontraram uma média de sobrevida semelhante para as pacientes sintomáticas (9 meses), mas a média de sobrevida não foi alcançada para as assintomáticas. Duyn et al.[64] e Sartori et al.[63] observaram média de sobrevida de 12 meses a partir da detecção da recidiva, sendo de 10 meses para as pacientes sintomáticas e 17 meses para as assintomáticas no estudo de Sartori et al.[63].

Embora o número de pacientes assintomáticas no momento da detecção da recidiva tenha sido pequeno em relação às sintomáticas, o estudo de Bodurka-Bevers et al.[60] demonstrou que a detecção de recidivas assintomáticas está associada com ambas sobrevida geral e sobrevida a partir do tempo inicial de detecção da recidiva prolongadas, sugerindo assim a importância de um programa de vigilância pós-terapia em detectar recidiva de câncer cervical em um momento onde a intervenção terapêutica possa significantemente ter impacto na sobrevida geral[60].

Assim, para cada 100 pacientes com a doença em estadio inicial, cerca de 20 pacientes recidivam; dessas, cerca de cinco têm uma recidiva central e cerca de duas podem ser curadas por tratamentos futuros[7].

1.11 Testes para detecção de recidivas e monitoramento da resposta ao tratamento

Os testes utilizados para seguimento de pacientes submetidas a tratamento contra câncer cervical são: exame físico (inspeção visual ou relato das pacientes), raios-X de tórax, teste de Papanicolaou (teste citológico), tomografia computadorizada (CT scan), ressonância magnética, ultrassom e testes moleculares[6, 7, 65, 66]. Porém, ainda não há uma boa metodologia estabelecida para a detecção da recidiva de câncer cervical[61].

Mabuchi et al.[65] investigaram retrospectivamente o papel de diferentes procedimentos no seguimento de 146 pacientes com câncer cervical, previamente tratadas com radioterapia e que apresentaram recorrência da doença. As pacientes que tiveram a recorrência da doença detectada por qualquer um dos procedimentos realizados (teste de Papanicolaou, raio-X de tórax, CT scan, exame físico)

apresentaram sobrevida significantemente maior do que aquelas detectadas por sintomas. Quando analisados em relação ao intervalo de tempo livre de doença, o exame físico e a CT obtiveram maior intervalo de tempo de detecção em relação ao teste de Papanicolaou e raios-X de tórax, sendo de um a cinco anos contra um a dois anos, respectivamente[65].

Um estudo para avaliar o valor do teste de captura híbrida (CH) para HPV no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino por cirurgia de alta freqüência (CAF) devido à presença de lesão intraepitelial de alto grau mostrou que a CH pode ser usada como teste preditivo de recorrência durante o seguimento destas pacientes por apresentar alto valor preditivo negativo (VPN) de doença. Este teste apresentou sensibilidade de 83,3%, especificidade de 87,8%, VPP de 50% e VPN de 97,3%, no primeiro retorno após seis meses do procedimento cirúrgico. Como o VPN do teste foi bastante alto, o seu resultado negativo para HPV seis meses após o tratamento indica uma baixa taxa de recorrência da doença, assim como a comprovação da presença do DNA HPV neste período é considerado forte evidência de recorrência da doença[67]. Outro estudo de Roncaglia et al.[68] avaliou se o teste de HPV (captura híbrida) após tratamento com conização em pacientes com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC II e III) tinha alguma utilidade potencial para predizer a resposta da paciente ao tratamento, isto é, se havia a presença de doença residual ou recidiva e verificaram que o teste de HPV negativo foi correlacionado com a ausência de lesão de alto grau após dois anos de seguimento pós-conização, o que fortemente sugere que um teste HPV negativo prediz a ausência de doença cervical[68].

Zola et al.[62] analisaram o estado de pacientes tratadas por câncer cervical no momento da visita agendada no seguimento pós-tratamento, como assintomática ou sintomática, e pode constatar que 29,7% das pacientes eram sintomáticas e tiveram que antecipar a visita, 20,2% relataram os sintomas no momento da visita

do *follow-up* e 50% eram assintomáticas, sendo necessário o agendamento de nova visita ou realização de exames para a confirmação do diagnóstico[62].

Duyn e cols[64] fizeram uma análise semelhante e constataram que das 277 pacientes que foram tratadas por câncer cervical, 32% das recorrências da doença foram identificadas no momento da visita agendada de *follow-up,* 45% das recorrências foram detectadas após auto-referência na visita.

As formas de detecção das recidivas variam bastante, mas na maioria dos casos elas são detectadas tardiamente quando já existem sintomas[63]. No estudo de Duyn e cols[64], quase a maioria de todas as recorrências de câncer cervical foram detectadas pela presença de sintomas relatados pelas pacientes (87%). Porém, diferentemente de outros achados na literatura, este estudo mostrou que ter a doença sintomática ou assintomática no momento do diagnóstico de recidiva, não tem valor prognóstico significante[64]. Sartori e cols[63] verificaram que 65% dos casos de recidiva de câncer cervical ocorreram em pacientes sintomáticos.

Há poucos estudos que avaliam a possibilidade do uso do teste de HPV na vigilância de recidiva da doença. Yu e cols.[61] analisaram retrospectivamente pacientes tratadas por câncer cervical para verificar o papel do teste de HPV de alto-risco (CH) em predizer recidiva da doença no seguimento, em amostras de citologia líquida. Das pacientes que recidivaram, 42% apresentaram-se positivas no teste de HPV de alto-risco no período de seguimento, enquanto a citologia cérvico-vaginal apresentou capacidade limitada em predizer recidiva (5,7%), a combinação da citologia com o teste para HPV de alto-risco aumentou a deteção do teste para 89,3%. O risco relativo para desenvolvimento de recidiva de câncer cervical nas pacientes com resultado de teste de HPV de alto-risco positivo foi estatisticamente significante. Em relação às recidivas, a presença do HPV de alto-risco precedeu seu diagnóstico, variando de 0 a 11 meses com média de 2,8 meses. Dessa forma,

sugerem que a persistência de HPV de alto-risco no seguimento seja um fator de risco para recidiva da doença[61].

Assim, reforça-se o valor de um teste molecular, somado a outros disponíveis como o diagnóstico por imagem, no seguimento de pacientes submetidas a tratamento, para identificar aquelas com maior probabilidade de recorrência ou persistência da doença e monitorar a resposta terapêutica.

1.12 DNA livre-circulante (cf-DNA)

A descoberta da presença de ácidos nucléicos livres no plasma (cell-free nucleic acid – cfNA ou circulating cell-free DNA - ccfDNA) abriu várias possibilidades de diagnóstico não-invasivo, monitoramento e prognóstico de doenças. Várias áreas da medicina puderam aplicar o uso deste teste diagnóstico como a oncologia, transplante, traumatologia e medicina fetal[69].

Alguns autores chamam de “biópsia líquida” por evitar a necessidade de se retirar fragmentos de tecido, permitindo assim a coleta de amostras de sangue repetidas e consequentemente permitindo-se traçar mudanças no cfNA durante o curso natural da doença ou durante o tratamento do câncer[70-75].

Em 1948, Mandel e Métais identificaram DNA no plasma e no soro de indivíduos saudáveis e doentes, usando um método de precipitação com ácido perclórico[76]. Eles também puderam observar grandes quantidades de DNA no plasma de mulheres grávidas[77]. Na década de 60, foi demonstrado que pacientes com lúpus eritematoso sistêmico apresentavam grandes quantidades de DNA no plasma[78]. Na década de 70, foi reconhecida a existência de DNA e RNA alterados no plasma de pacientes com câncer[79]. Leon e cols[79] observaram que os níveis de DNA circulante no soro dos pacientes com câncer eram maiores em relação aos

indivíduos saudáveis, principalmente nos pacientes com doença metastática. Após realização de radioterapia, pacientes que respondiam ao tratamento apresentavam redução nos níveis de DNA circulante[79]. Nesta mesma década outras doenças também foram estudadas e observou-se que níveis aumentados de DNA fita simples na circulação sangüínea podiam ser detectados em doenças como artrite reumatóide, leucemia, tumores sólidos, nefrite glomerular, pancreatite e hepatites[80].

Apenas no final dos anos 80, observou-se que esse DNA plasmático apresentava alterações que estavam associadas ao tumor[71]. Já na década de 90, diversas alterações foram identificadas, como a detecção de fragmentos do gene RAS mutado no sangue de pacientes com câncer[8, 81, 82]. Essas alterações genéticas podem ser: alta expressão de oncogenes, pequena expressão de genes supressores de tumores, alterações de microsatélites, perda de heterogozidade, integridade de sequências repetidas do DNA genômico não-codificantes, alterações do DNA mitocondrial. Outras alterações não genéticas encontradas também foram associadas ao tumor, como mudanças epigenéticas (hiper ou hipometilação de genes) e níveis aumentados de DNA plasmático em pacientes com câncer em relação à pacientes saudáveis[10, 82, 83].

Outra descoberta importante foi a presença de DNA fetal na circulação materna, a qual representa significante potencial de aplicação clínica no diagnóstico pré-natal de doenças genéticas do feto, como as aneuploidias cromossomiais, e complicações associadas à gravidez, como a incompatibilidade entre RhD materno-fetal[84, 85].

A utilização do diagnóstico não-invasivo nesta área também pode ser utilizada para a determinação do sexo fetal, a partir da análise da presença ou ausência de sequências do cromossomo Y, indicando feto do sexo masculino na presença e sexo feminino na ausência deste[86].

Contudo, os níveis de ácidos nucléicos no plasma podem também refletir processos fisiológicos e patológicos que não são específicos do tumor, podendo ser identificados em quantidades aumentadas em pacientes com lesões benignas, doenças inflamatórias, infarto do miocárdio, insuficiência renal, cirurgias, fraturas, trauma tecidual e sepse[9, 73, 82].

Snyder et al.[87] analisaram o DNA circulante no plasma de receptores de transplante cardíaco e conseguiram detectar por análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) níveis aumentados de DNA do doador no sangue do receptor em momentos de rejeição celular aguda e sugerem o uso deste teste molecular não-invasivo para ser aplicado no monitoramento de rejeição em outros órgãos sólidos[87].

A forma como os ácidos nucléicos livre-circulantes são liberados na corrente sanguínea ainda não está bem compreendida, mas acredita-se que sejam eliminados através da morte de células tumorais por apoptose e necrose ou por secreção pela própria célula. Macrófagos podem fagocitar células necróticas e apoptóticas e liberar o DNA digerido no microambiente tumoral. Acredita-se que células de tumor que circulam no sangue e micrometástases também podem liberar material genético[73, 82, 88] (Figura 4).

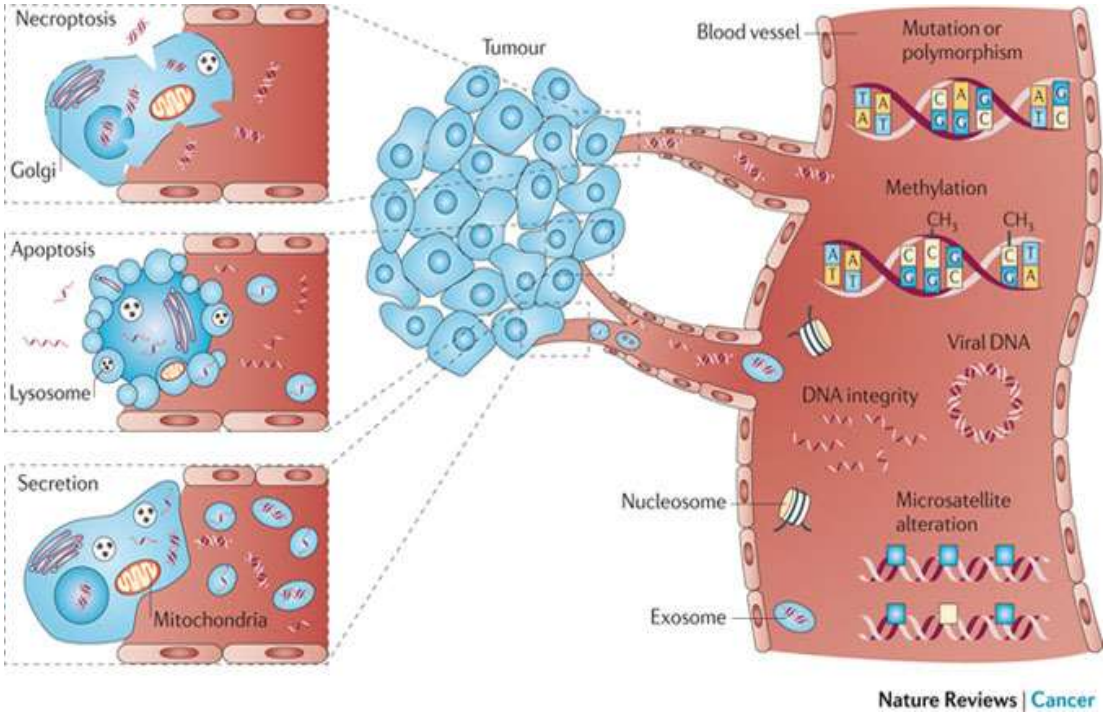


Figura 4 – Mecanismos de liberação de ácidos nucléicos no sangue e suas diferentes formas circulantes.
Fonte: Schwarzenbach H. et al., 2011[82]

O tipo de eliminação pode ser distinguido entre processo apoptótico ou necrótico, comparando-se o tamanho do fragmento de cfDNA produzido. Células que sofrem morte celular programada – apoptose – são acompanhadas de uma degradação fisiologicamente orquestrada do DNA genômico, a qual resulta em fragmentos pequenos e uniformes (~180-200 pares de bases). Em contraste, na necrose celular forma-se uma grande variedade de fragmentos com tamanhos diversos como consequência da digestão ao acaso[73] (Figura 5).

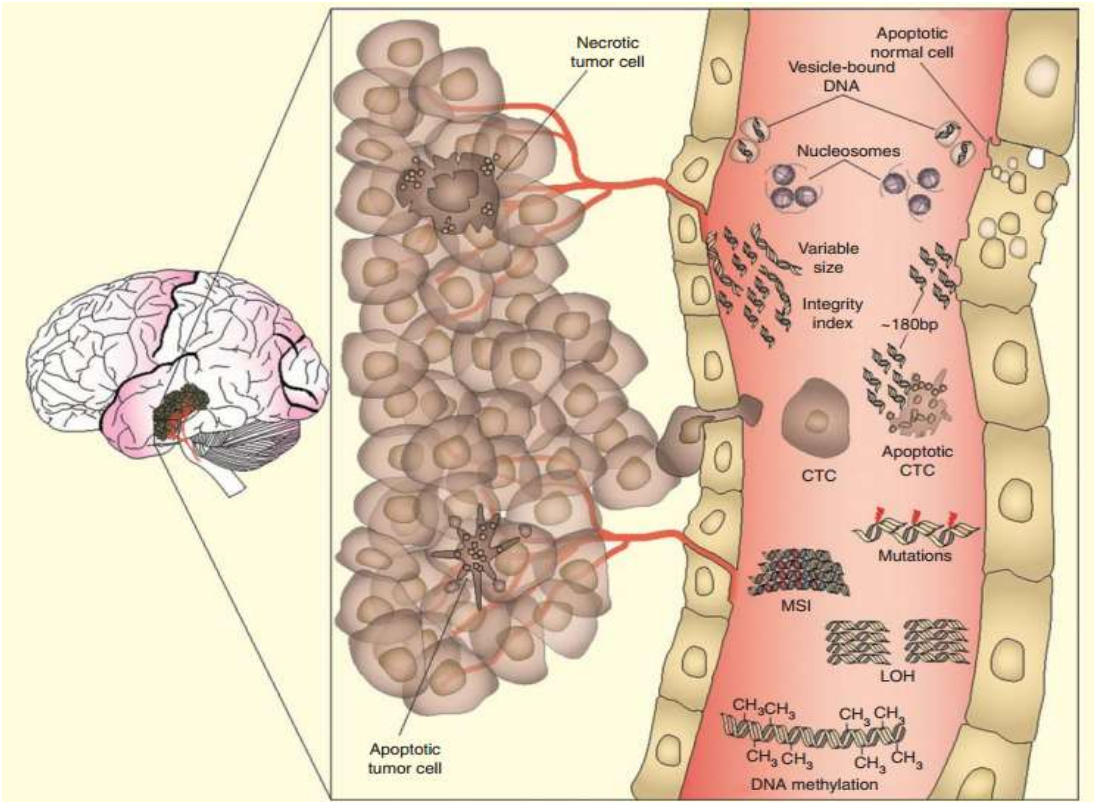


Figura 5 – Origem dos ácidos nucléicos no sangue (cfDNA) por necrose ou apoptose, variabilidade no tamanho dos fragmentos e alterações genéticas associadas ao tumor.
Fonte: Marzese DM. et al., 2013[73]

A quantidade de DNA presente no sangue varia de acordo com a capacidade de eliminação, degradação e outros eventos fisiológicos da circulação sanguínea e linfática. Outros estudos mostram que a forma como ele se encontra livre no sangue vai influenciar a sua permanência, por exemplo, DNAs dupla-fita e circular podem permanecer por mais tempo do que DNAs fita-simples e linear[82] (Figura 4 e 5).

Uma das grandes dificuldades na avaliação da presença de cfNA é em relação a padronização dos ensaios, tanto na fase pré como pós-analítica. Ainda são bastante controversas questões como: estabelecer um padrão de condições e tecnologia para validar os ensaios, melhor especificidade e sensibilidade do teste, qual a amostra mais adequada (plasma ou soro), tempo de coleta e

armazenamento das amostras e eficácia dos procedimentos de extração. Melhoras nesses aspectos são necessárias para um análise de cfNA mais robusta, consistente, reprodutível, precisa e informativa[73, 82, 89].

No caso dos cânceres com etiologia viral, como por exemplo, carcinoma nasofaríngeo, Linfoma de Burkkit e Doença de Hodking associados à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), carcinoma hepatocelular associado ao vírus da Hepatite B (HBV) e câncer de colo do útero e carcinoma de células escamosas da orofaringe, ambos causados pela infecção por HPV, a detecção do genoma viral no plasma ou soro dos pacientes pode ser útil como ferramenta para a detecção precoce e monitoramento do tratamento[10, 82, 83, 90].

Estudo realizado com pacientes portadores de carcinoma nasofaríngeo causado pelo Epstein-Barr virus (EBV) detectou o DNA do EBV no plasma em 96% dos casos. Além disso, associou-se a quantidade de DNA viral detectado ao estágio do tumor[91]. Estudos subsequentes mostraram que a quantidade de DNA de EBV circulante era um importante fator prognóstico de sobrevida, independente do estágio do câncer[92, 93]. A concentração plasmática de DNA do EBV, após a conclusão da radioterapia, correlaciona-se com a sobrevida, sendo que concentrações indetectáveis estão relacionadas à ausência de recaída[94, 95]. Em metade dos pacientes com recidiva do câncer de nasofaringe estudados por Lin e cols.[94], a elevação da concentração plasmática do DNA do EBV foi observada seis meses antes da recidiva ser detectada clinicamente. Este tipo de câncer de etiologia viral pode ser exaustivamente estudado, assim técnicas de detecção do DNA viral a partir de PCR em tempo real puderam ser padronizadas.

No entanto, técnicas de PCR em tempo real para a detecção do genoma do HPV no plasma de pacientes acometidos por câncer cervical ainda não estão padronizadas como ocorre com o EBV.

Os estudos de detecção do DNA do HPV no plasma de pacientes com câncer cervical apresentam resultados contraditórios (variando de 7 a 70% de detecção) e são de difícil comparação devido às diferentes populações estudadas, diferentes técnicas de extração, de amplificação de material genético e oligonucleotídoes iniciadores utilizados[11, 12, 66, 82, 88, 96-106].

Alguns estudos mostram que a prevalência e a carga viral plasmática do HPV é baixa mesmo em pacientes com câncer cervical, mas é específica para este tipo de câncer, ou seja, pacientes com citologia normal ou LSIL, geralmente, apresentam carga viral indetectável[11, 88, 96-99, 104]. Dong e cols.[97] demonstraram que pacientes com carcinoma cervical apresentavam maior carga viral plasmática do que os com carcinoma *in situ*.

A detecção do material genético do HPV no plasma estaria associada à presença de metástase[11, 106, 107] ou à tendência de desenvolver recidiva da doença[11, 12, 99, 100] e seria mais freqüente em casos de carcinoma do que naqueles de adenocarcinoma ou com algum envolvimento glandular[97, 101].

Estudos que utilizaram metodologia de PCR em tempo real ou *nested* PCR alcançaram taxas de detecção em torno de 48% a 65%[66, 88, 102, 103].

Wei e cols.[103] utilizaram um *nested* PCR que aumentou a sensibilidade e foi capaz de detectar 1 cópia de genoma do HPV. Ainda neste trabalho, não houve correlação da detecção do DNA plasmático do HPV com a presença de metástase nos linfonodos pélvicos ou para-aórticos.

Yang e cols.[66] foram capazes de detectar o genoma do HPV-16 no plasma de 50% (25/50) das pacientes com câncer cervical (CC), 33,3% (6/18) das pacientes com lesão de alto grau (NIC II e III), 20% (3/15) daquelas com lesão de baixo grau (NIC I e condiloma) e 13,5% dos controles normais. A freqüência do DNA do HPV-16 no plasma foi significativamente maior em pacientes com câncer cervical do que com lesão de baixo grau e indivíduos controle, mas igual à

apresentada por indivíduos com lesão de alto grau, assim como a carga viral plasmática. Também estudaram a presença de DNA de HPV-18, o qual foi detectado em 6% (3/50) dos casos de câncer cervical, 1% dos controles normais e negativo nas lesões de alto e baixo grau[66]. Porém, a confiabilidade destes resultados deve ser questionada uma vez que a presença de DNA de HPV em lesões de baixo grau e em controles normais não é esperada, visto que o HPV tem tropismo por células epiteliais e que seu ciclo de vida ocorre inteiramente dentro dos tecidos epiteliais, ou seja, não circula na corrente sanguínea.

Jaberipour e cols.[101] utilizaram um PCR em tempo real específico para o gene E6 dos tipos de HPV-16, 18, 33 e 52. Das 81 amostras de câncer cervical, somente 19 (23,5%) foram positivas para DNA de HPV no plasma. Destas, 18,5% foram positivas para HPV-18 e 5% positivas para HPV-16, diferindo dos achados da maioria dos estudos nos quais o HPV-16 é o mais frequentemente encontrado. Os HPVs-33 e 52 não foram identificados nas amostras de câncer e nenhum dos tipos estudados foi identificado nas amostras de lesão intraepitelial cervical[101].

Gnanamony e cols[88] também usaram PCR em tempo real com iniciadores específicos para HPV-16 e 18 e foram capazes de identificar o DNA do HPV-16 ou 18 no plasma de 56,4% e 20,0% das mulheres que apresentavam esses mesmos tipos de HPV no tecido cervical, respectivamente. Não foi observada correlação entre a carga viral absoluta no plasma e o estadiamento da doença porém, para HPV 16, foi verificado que houve correlação entre presença de DNA de HPV 16 no plasma com o estadiamento da doença. Em estádios mais avançados, foi maior a positividade[88].

Ho e cols.[102] identificaram o DNA do HPV no plasma de 48% dos pacientes com câncer cervical, que tiveram esse vírus detectado no tecido cervical. A presença do DNA viral no plasma não foi associada com o estágio do tumor[102].

Dong e cols.[97] também demonstraram que pacientes com câncer cervical apresentavam maior carga viral plasmática do que os com câncer *in situ*.

Apesar da maioria dos carcinomas de nasofaringe e cervical serem carcinomas de células escamosas e alguns cânceres cervicais serem linfoepiteliomas, ou seja, tumor epitelial escamoso com grande infiltrado linfocítico, que é similar ao carcinoma de nasofaringe, a presença de DNA de EBV e HPV no plasma apresenta aspectos distintos, incluindo prevalência e mecanismo de liberação do DNA tumoral[107].

O EBV apresenta ciclo viral sistêmico infectando linfócitos B e epitélio da nasofaringe e mesmo em células malignas permanece na forma episssomal. A alta incidência (70% a 96%) e o grande número de cópias do genoma viral (4000 a 90.000 cópias/mL) no plasma sugerem intensa liberação do DNA viral para a circulação[107].

O HPV apresenta ciclo viral local (epitélio cervical) e em células malignas apresenta-se integrado ao genoma da célula hospedeira. A baixa taxa de detecção (aproximadamente 20 a 30%) e o número de cópias de DNA viral no plasma (1 a 35 cópias/mL) sugere que o mecanismo de liberação do DNA tumoral para a circulação seja menos eficiente[107].

Em virtude desse processo de liberação do material genético do tumor para a circulação, no caso do HPV, ser menos eficaz, ele ocorreria em estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer, quando é mais esperada a presença de metástases. Devido a esse fato, os estudos encontrariam essa associação entre a detecção do genoma do HPV no plasma e a presença de metástases[107].

Essa técnica de detecção do genoma viral no plasma do paciente pode ser importante tanto para a detecção de estágios mais avançados do câncer, como para o monitoramento do tratamento. Estudos têm demonstrado que após o tratamento, o genoma viral não é mais detectado no plasma de pacientes que

apresentam resposta completa à terapia, podendo continuar a ser detectado ou ressurgir em pacientes com doença persistente, metástase ou recidiva[12, 66, 100, 102]. Estes resultados estão compilados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Prevalência do DNA de HPV no plasma de pacientes com câncer cervical em diferentes estudos.

Autor (ano)	HPV DNA+	N=	%	Técnica de Detecção
Dong (2002)	12	175	6,9	PCR E7 e qPCR Real Time E7
Pornthanakasem (2001)	6	50	12	PCR convencional E6
Sathish (2004)	8	58	13,8	PCR primers consenso, tipados RFLP e sequenciamento
Liu (2001)	12	60	20	PCR convencional E6E7, Nested PCR
Jaberipour	19	81	23,5	qPCR Real Time E6, kit comercial
Hsu (2003)	27	112	24,1	PCR primers consenso L1 e tipo-específico E7
Singh (2006)	11	44	25	PCR primers HPV-16 E7 e HPV-18 LCR
Ho (2005)	16	60	26,7	qPCR Real Time, kit comercial (21,7% HPV 16 e 18)
Shimada (2010)	6	20	30	PCR primers consenso L1 e RFLP
Widschwendter (2003)	42	94	44,7	PCR primers consenso +EIA
Gnanamony (2010)	56	108	51,9	qPCR Real Time E6/E7
Arias (2010)	46	85	54,1	PCR primers HPV-16 e HPV-18 E6/E7
Yang (2004)	28	50	56	qPCR Real Time E6
Wei (2007)	11	17	64,7	Nested-PCR primers consenso L1 e RFLP (35% HPV 16 e 18)
Duenas (2001)	49	70	70	PCR primers L1
TOTAL	349	1084	32,2%	

Outros tipos de câncer vêm sendo estudados por apresentarem associação com a infecção pelo HPV, como os cânceres de cabeça, pescoço e pulmão; e alguns deles tentaram detectar a presença do DNA viral na circulação sanguínea, como marcador de risco para esses cânceres e relacionar com metástases, recorrência da doença e sobrevida, usando PCR convencional e PCR em Tempo Real quantitativo[90, 108-110].

No estudo de Capone et al.[108], 13 de 70 pacientes com carcinoma de orofaringe foram positivos para HPV no tumor. Usando a técnica de PCR convencional para a região E7 e hibridização por Southern blotting, foram detectados quatro pacientes positivos para DNA de HPV-16 no soro (6%). Usando o PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR), foram encontrados seis pacientes positivos no soro, isto é, 46,1% (6/13), sendo que todos eles foram positivos também para E7 no tumor correspondente, e destes seis, quatro desenvolveram metástases distantes, enquanto que os outros sete pacientes negativos para DNA de HPV no plasma, não apresentaram metástases[108].

Cao et al.[110] demonstraram que 65% dos pacientes com carcinoma de orofaríngе positivos para HPV tiveram DNA de HPV detectado no plasma, e que os pacientes negativos para HPV no tumor, e os controles saudáveis foram todos negativos para DNA de HPV no plasma. Em relação à carga viral no plasma pré-tratamento, observaram que o número de cópias de DNA de HPV estava relacionado ao volume do tumor metastático e que as cópias de HPV declinavam rapidamente após o início do tratamento[110].

Dahlstrom et al.[90] avaliaram o uso dos níveis de DNA de HPV no soro como um marcador de recidiva da doença, e encontraram associação da presença de DNA de HPV circulante no soro pré-tratamento de alguns pacientes com carcinoma de orofaringe à maior categoria N (nódulo-linfonodos) e estadiamento TMN IV da doença, mas não como o tamanho do tumor primário. Neste estudo, 12 pacientes

que foram positivos para DNA de HPV no tumor desenvolveram recidiva da doença, e 7 desses 12 pacientes (58%) tiveram DNA de HPV detectável no soro pré-tratamento. Pacientes com estádios mais avançados e linfonodos comprometidos tiveram maiores taxas de DNA de HPV detectável no soro pré-tratamento. Em relação aos pacientes positivos para DNA de HPV no tumor, aqueles que foram negativos para DNA de HPV no soro pré-tratamento apresentaram uma melhor sobrevida livre de progressão da doença, do que aqueles que foram positivos para HPV no soro pré-tratamento. Também não foram encontradas diferenças significantes nos níveis de DNA de HPV entre pacientes com e sem recorrência da doença. Contudo, concluíram que o DNA de HPV no soro pré-tratamento não parece ter utilidade clínica como um marcador de recidiva da doença, entre pacientes com carcinoma de orofaringe[90].

Ahn et al.[109] fizeram uma análise comparando a presença de DNA de HPV na saliva e plasma de pacientes com carcinoma de orofaringe e observaram que a presença do DNA viral nestes líquidos estava associada a um menor tempo livre de doença. Analisando só as amostras de plasma, de 52 pacientes HPV positivos no tumor, 35 foram positivos para DNA de HPV no plasma pré-tratamento (67,3%), seis foram positivos no plasma pós-tratamento (11,5%) e oito tiveram recidiva da doença (15,4%). Em relação à sobrevida global, os pacientes positivos para DNA de HPV na saliva pós-tratamento e aqueles com status de DNA de HPV positivo em ambos, saliva e plasma, apresentaram sobrevida global reduzida, mas não entre aqueles que tinham status de HPV positivo apenas no plasma[109].

Um estudo em Taiwan procurou a presença do DNA dos HPVs 16 e 18 no sangue total de 149 pacientes com câncer de pulmão, como marcadores de risco para este câncer, pela técnica de Nested PCR. Verificaram que 47,7% dos pacientes foram positivos para HPV 16 e 30,9% foram positivos para HPV 18 no sangue total. Em relação ao estadio da doença, pacientes positivos para HPV 16

foram significantemente relacionados a estadios mais avançados da doença. Porém, vale ressaltar que este estudo buscou a presença do DNA viral no sangue periférico total, ou seja, é mais provável que o DNA do HPV seja oriundo de células do tumor liberadas na corrente sanguínea, ou que os linfócitos periféricos abriguem partículas de HPV[111].

O cf-DNA além de poder ser utilizado como biomarcador de pacientes sob risco de recaída da doença, pode ser bastante útil no monitoramento da resposta terapêutica. Cao e cols[110] utilizaram a detecção de DNA de HPV no plasma de pacientes com carcinoma de orofaringe, DNA de HPV-positivos no tumor, para verificar se o DNA de HPV podia ser detectado no plasma desses pacientes e para monitorar a resposta ao tratamento durante a radioterapia. O DNA de HPV foi detectado em 65% das amostras de plasma pós-tratamento e a carga viral correlacionou-se significantemente com o volume do tumor. A medição do DNA de HPV no plasma desses pacientes mostrou um rápido declínio, até se tornar indetectável no final do tratamento. Em 3 pacientes que apresentaram metástases após o final do tratamento, o DNA de HPV voltou a ser detectado[110].

A principal ferramenta para monitorar recidiva do câncer do colo do útero é o diagnóstico precoce. Portanto, o desenvolvimento e a padronização de testes laboratoriais não invasivos, capazes de identificar biomarcadores tumorais e diagnosticar a doença em fase inicial, aumenta a chance de cura através da utilização dos tratamentos preconizados.

1.12.1 Influência de fatores pré-analíticos sobre a análise de cfDNA

Como citado anteriormente, um dos grandes desafios na avaliação da presença de cfDNA como biomarcador, a ser disponibilizado para o uso na prática clínica, é a ausência de consistência entre os vários protocolos de manipulação da amostra e técnicas para análise, ou seja, ainda não há uma padronização adequada neste campo. Alguns trabalhos atribuem uma falta de comparabilidade entre resultados às diferenças nos métodos de processamento das amostras, condições de armazenamento e nas técnicas para extração e quantificação[9, 72, 73, 82, 89, 112-115].

Na literatura encontramos dados conflitantes, como por exemplo, a concentração de cfDNA em pacientes com câncer, variando de poucos ng/mL a milhares de ng/mL, os quais se sobrepõem à variação de indivíduos saudáveis[9, 82, 112] e a fragmentação do cfDNA em pacientes com câncer sendo menor, equivalente ou maior do que os indivíduos saudáveis[70, 71, 73, 114, 116]. O estágio da extração também é um fator crítico para garantir uma sensibilidade clínica dos métodos analíticos que medem frações mínimas de ácidos nucléicos, como por exemplo, nos casos de sequências de DNA fetal no predominante DNA materno[73, 89, 113].

Os trabalhos que avaliam a influência dos procedimentos pré-analíticos sobre a quantidade (concentração) e integridade (fragmentação), considerados como parâmetros de qualidade, mostram que ambas podem ser afetadas, dependendo das condições de coleta do sangue e de seu armazenamento, da separação e armazenamento do plasma, das técnicas de extração utilizadas e do armazenamento do cfDNA extraído[113-115].

Um programa europeu conhecido como SIPIDIA-DNAplas, subprojeto do SPIDIA (Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and

procedures for in vitro diagnostics), financiado pela União Européia, foi realizado com a proposta de avaliar a influência da fase pré-analítica sobre os parâmetros de qualidade (integridade) e quantidade (concentração) do cfDNA. Participaram cerca de 50 laboratórios, os quais foram agrupados de acordo com a temperatura e tempo de armazenamento do plasma, a partir do recebimento do sangue e centrifugação, e com o método de extração utilizado. Os métodos de extração utilizados foram classificados como “genéricos” (método de extração de ácidos nucléicos não-específicos para isolar cfDNA ou para amostras de plasma), “adequados” (métodos que permitem a recuperação de cfDNA e outros ácidos nucléicos) e “específicos” (específico para a recuperação de cfDNA –humano e viral- de plasma e soro). Neste projeto, nenhuma das variáveis pré-analíticas (tempo de armazenamento entre obtenção do plasma e extração, temperatura de armazenamento e método de extração) foi significantemente associada com a quantidade e integridade do cfDNA mas, considerando as amostras que foram extraídas dentro de três dias da obtenção do plasma, os métodos de extração especificamente desenvolvidos para preservar o cfDNA preservaram melhor a integridade do cfDNA (não encontrava-se fragmentado) em comparação aos métodos genéricos e adequados. Em relação à quantidade total de cfDNA obtida, os métodos específicos foram mais homogêneos, em termos de distribuição de concentração, em comparação aos métodos genéricos, que foram mais amplos. Dessa forma, o SPIDIA-DNAplas recomenda o uso de métodos de extração especificamente desenvolvidos para o isolamento do cfDNA do plasma[113].

Devonshire e cols.[89] compararam diferentes kits comerciais específicos para extração de cfDNA e de plasma com um kit para extração de ácidos nucléicos do sangue e verificou que a quantidade de cfDNA por mililitro de plasma era 2,5 vezes maior quando extraído com o kit específico, em comparação ao kit não específico[89].

Ainda em relação à extração, outros fatores também podem influenciar na qualidade da análise do cfDNA. Os kits comerciais específicos para cfDNA permitem o uso de maior volume para extração e pequenos volumes de eluição, o que pode levar ao aumento da presença de inibidores no eluído gerando problemas associados à amplificação de amostras, com baixo número de cópias em métodos de análise como o qPCR[89].

Segundo Widschwendter e cols.[12], o método de extração de DNA e os iniciadores utilizados para amplificar o DNA de HPV são fatores cruciais para a detecção de um DNA de boa qualidade, e para avaliar esses fatores fizeram a comparação de dois kits comerciais com o método de extração fenol/clorofórmio e diferentes métodos de PCR para HPV, a fim de verificar qual desses métodos apresentava a melhor performance para a detecção de DNA de HPV no soro. Verificou-se que o método de extração usando fenol/clorofórmio foi o que obteve melhor quantidade e qualidade na recuperação de DNA, enquanto que os kits comerciais foram menos eficientes em extrair o DNA viral[12]. Liu e cols[96] também obtiveram uma maior porcentagem de DNA de HPV usando o método de extração fenol/clorofórmio.

Cao e cols.[110] testaram dois volumes de plasma utilizados para a extração do DNA (0,2mL e 0,6mL) em pacientes com carcinoma de orofaringe HPV-positivos por qPCR e verificaram que a taxa de detecção de positivos, partindo-se de um volume maior, aumentou significantemente a quantidade de DNA extraído e, consequentemente, houve um aumento na taxa de de DNA de HPV (70,8% para 0,6mL versus 29,1% para 0,2mL).

Baseando-se nessas informações, torna-se clara a necessidade de se estabelecer uma padronização de procedimentos técnicos como métodos de processamento das amostras, condições de armazenamento, procedimentos para extração e quantificação, que possam afetar a qualidade e quantidade de cfDNA.

El Messaoudi e cols[114] fizeram um estudo de revisão e analisaram todos os parâmetros pré-analíticos que pudessem potencialmente afetar a qualidade do cfDNA em cada etapa do processo, desde a coleta do sangue até o armazenamento do cfDNA extraído. Baseados nos achados da literatura e de suas pesquisas, eles puderam sugerir um protocolo pré-analítico ideal, listado abaixo:

A. Coleta de sangue ideal:

A.1 Soro ou plasma: o plasma é uma matriz melhor que o soro. El Messaoudi e cols[114] verificaram que usando um conjunto de primers tipo-selvagem para KRAS humano, a concentração de cfDNA era maior nas amostras de plasma do que no soro, confirmando a hipótese de que a quantidade aumentada de cfDNA em amostras de soro, observada em alguns estudos, era devido a liberação de DNA das células sanguíneas. Portanto, o plasma é a matriz de escolha, desde que ele evita a contaminação do cfDNA com DNA genômicodas células sanguíneas.

A.2 Anticoagulante: o uso de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) é recomendado para garantir a estabilidade do cfDNA.

A.3 Tubo coletor de sangue: no campo da oncologia não há estudos comparando o uso de tubos de EDTA com tubos de coleta de cell-free DNA™ blood collection tubes, usados no diagnóstico pré-natal. Ambos podem ser a escolha por prevenirem a lise das células sanguíneas.

B. Manipulação do sangue entre a coleta e processamento ideal:

B.1 Influência das condições de armazenamento do sangue na concentração de cfDNA: as amostras de sangue devem ser cuidadosamente retiradas para evitar hemólise, pois pode levar a um aumento nos níveis de nucleossomos e fragmentação do cfDNA; as amostras podem ser mantidas indiferentemente a temperatura ambiente

(TA) ou +4°C por até 4-6h pois após este período pode haver um leve aumento na concentração e na fragmentação do cfDNA; agitação das amostras de sangue deve ser evitada.

B.2 Processamento do sangue para obtenção do plasma: o sangue deve ser processado dentro de 4h após a coleta para preservar a concentração e fragmentação do cfDNA. Recomenda-se fazer um primeiro passo de centrifugação a 1.200-1.600g por 10min, da amostra de sangue para obtenção do plasma e uma segunda centrifugação de alta velocidade do plasma obtido, a 16.000g por 10min, para garantir a ausência de qualquer célula no plasma. Este segundo passo pode ser indiferentemente realizado antes ou depois do armazenamento do plasma a temperatura de -20°C ou -80°C.

C. Manipulação das amostras de plasma entre a obtenção do plasma e a extração do ácido nucléico:

C.1 Influência das condições de armazenamento do plasma antes da extração: a temperatura de armazenamento e o tempo decorrido entre o processamento do sangue podem influenciar na concentração e na integridade do cfDNA. El Messaoudi e cols[114] verificaram que há um leve aumento na concentração de cfDNA com o tempo decorrido antes da extração (de 0 a 4h) e que a integridade não foi afetada. Notaram que as maiores concentrações de cfDNA e valores de integridade foram observados quando as amostras foram armazenadas abaixo de +4°C. Assim, propõem que se a extração for feita mais tarde, após o processamento do sangue, as amostras de plasma devem ser armazenadas a -20°C ou -80°C. Se a extração for feita logo após o processamento do sangue, as amostras de plasma devem ser armazenadas a +4°C por até 3h.

C.2 Influência dos ciclos de descongelamento sobre o plasma: El Messaoudi e cols[114] confirmaram a influência das variações de temperatura na sensibilidade do cfDNA no plasma, demonstrando que após três ciclos de congelamento-descongelamento sobre o plasma antes da extração, a integridade do cfDNA cai significantemente. Assim, propõem que as amostras de plasma podem ser submetidas a somente dois ciclos de congelamento-descongelamento, e que os plasmas devem ser aliquotados para evitar repetidos ciclos de congelamento-descongelamento, e armazenados a -80°C por até nove meses.

C.3 Influencia da temperatura sobre o cfDNA extraído entre a extração dos ácidos nucléicos e a análise do cfDNA: El Messaoudi e cols[114] testaram a influência dos ciclos de congelamento-descongelamento sobre o cfDNA extraído e armazenados a -20°C e verificaram que não há modificações na concentração e integridade dos extraídos até três ciclos, propondo assim que o cfDNA extraído deva ser armazenado a -20°C e deva ser submetido a até 3 ciclos de congelamento-descongelamento.

C.4 Tempo ideal de armazenamento das amostras de plasma e cfDNA extraídos: El Messaoudi e cols[114] verificaram que a concentração de cfDNA não variou em amostras de plasma congeladas por até nove meses e que para o cfDNA extraído houve uma discreta queda na concentração após três meses de armazenamento a -20°C. Estas informações mostram que o conteúdo de cfDNA decai com o aumento do tempo de armazenamento e que, se a análise objetiva quantificar ou caracterizar a fragmentação do cfDNA, é preferível trabalhar com extraídos de até três meses, mas se o objetivo é a detecção de sequências específicas ou mutações no cfDNA, é possível usar amostras de plasma ou cfDNA extraído congelados por nove meses ou anos a -20°C ou -80°C.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer cervical permanece como um desafio para a Saúde Pública, sendo o terceiro tipo de neoplasia maligna mais prevalente nas mulheres no mundo todo. A maior parte dos óbitos em decorrência dessa patologia ocorre em países em desenvolvimento. Estudos mostram que pacientes com câncer do colo do útero apresentam taxa de recidiva variando de 8% a 49%. Dentro de dois anos após término do tratamento, 62% a 89% das recidivas são detectadas. Em cinco anos, a proporção de detecção aumentou para 89% a 95% neste período[7, 60]. Atualmente, não há testes específicos disponíveis para detecção de recidiva. Exames de imagem, como raios-X, ressonância magnética e tomografia são utilizados. Outro teste realizado é a citopatologia da cúpula vaginal para detecção de recidiva na parede da vagina. Portanto, é desejável o desenvolvimento de um teste não invasivo capaz de detectar precocemente a recidiva do câncer cervical.

O monitoramento após o tratamento do câncer do colo uterino, com teste capaz de detectar o DNA do HPV, como biomarcador tumoral, pode contribuir para um diagnóstico mais precoce, uma vez que pode preceder o desenvolvimento de lesões histológicas e manifestações clínicas. A padronização e validação desse teste laboratorial poderão contribuir no planejamento de ações e estratégias aplicáveis aos programas de prevenção, detecção precoce e monitoramento de pacientes tratadas por lesões induzidas pelo HPV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Detecção de DNA de HPV no plasma, como potencial marcador precoce de recidiva após o tratamento do câncer de colo uterino.

3.2. Objetivos Específicos:

- Estimar a presença do DNA do HPV no plasma de pacientes com câncer de colo do útero.
- Padronização de um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR) para detecção do genoma do HPV em amostras de plasma.
- Determinação da sensibilidade e especificidade do protocolo de PCR em tempo real padronizado.

4 MÉTODOS

4.1 Modelo do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo de acompanhamento.

4.2 População de estudo e casuística

Foram selecionadas para este estudo pacientes com diagnóstico de câncer cervical invasivo, atendidas em dois grandes centros de tratamento oncológico do Estado de São Paulo: o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e Hospital do Câncer de Barretos (HCB), no período de novembro de 2009 a junho de 2012. Para serem inclusas neste estudo, as pacientes precisavam ser virgens de tratamento. Estas amostras foram coletadas para a tese de Doutorado da aluna Cristina Mendes de Oliveira com o título: “Existe câncer cervical HPV negativo?”[117].

Antes da coleta, em primeiro lugar, as pacientes eram informadas a respeito dos objetivos do estudo e, em seguida, as mesmas ou seus responsáveis assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após aceitarem participar do estudo, coletou-se um fragmento de 2 a 5 mm do tumor e um tubo de sangue total com EDTA e gel separador de 5ml (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) por punção venosa. As amostras foram coletadas no Ambulatório da Pelve ou no Centro Cirúrgico, pelo médico assistente.

Na primeira consulta da paciente do Ambulatório do ICESP, é rotina a coleta de um fragmento de tumor para a confirmação do diagnóstico anátomo-patológico, e neste momento, o médico assistente, coletava um segundo fragmento para a realização deste estudo.

As amostras de tumor, provenientes das pacientes submetidas a tratamento cirúrgico, foram obtidas após a retirada da peça e antes do encaminhamento da mesma para o exame anátomo-patológico. As amostras de sangue dessas pacientes foram coletadas pelo médico anestesista, após as pacientes estarem anestesiadas, mas sempre antes do início da cirurgia.

A coleta das amostras de sangue total, para monitoramento da presença de DNA do HPV no plasma das pacientes, seguiu o fluxo de retorno das mesmas para acompanhamento médico pós-tratamento, nos dois hospitais do estudo. Em média, a cada 3 ou 4 meses após o término do tratamento, um tubo de sangue total com gel separados e EDTA (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) foi coletado por punção venosa.

Para a realização da análise de dados, o estadiamento clínico, segundo FIGO - 2009[118] e o tipo histológico do tumor foram obtidos a partir da revisão dos prontuários médicos das pacientes.

O estadiamento clínico utilizado neste estudo foi realizado pelo médico assistente no momento da primeira consulta da paciente[118]. Já o tipo histológico do tumor foi determinado pelo exame anátomo-patológico da peça, após a retirada cirúrgica ou do fragmento coletado no Ambulatório, o qual foi realizado pelos laboratórios de anatomia patológica dos respectivos Serviços, segundo critérios definidos por Richart[119] (1973) e classificação histológica de tumores da cérvix uterina por WHO[120, 121].

O número de amostras (N) foi calculado com base em artigos publicados sobre o tema, considerando-se a prevalência média da presença de DNA de HPV no plasma ou soro de pacientes diagnosticadas com câncer do colo do útero de 30,0%. Considerando-se um intervalo de confiança de 95% e um erro máximo na estimativa de 7%, o N determinado foi de 165 mulheres com câncer cervical.

4.3 Aspectos éticos

Este projeto utiliza as amostras do estudo intitulado “Padronização e validação de PCR em tempo real para a detecção do DNA de HPV no plasma de pacientes com câncer de colo do útero” que foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 01 de julho de 2009, com número de protocolo 0451/09 e foi autorizado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP, Hospital de Câncer de Barretos - HC-Barretos e pela disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.4 Coleta das amostras

4.4.1 Tumor

Um fragmento de tumor foi coletado com pinça Gaylor-Medina, e em seguida, acondicionado em tubo contendo um ml de meio *Standard Transport Medium* – STM (Quiagen Biotecnologia do Brasil LTDA), e enviado para o Laboratório de Virologia - LIM 52 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, o qual foi mantido a -20°C até a realização das etapas laboratoriais seguintes.

Os fragmentos de tumores, das pacientes atendidas no HC-Barretos, foram coletados com pinça de Gaylor-Medina, imediatamente acondicionados em tubos de criopreservação, e mantidos em nitrogênio líquido até a realização da extração de DNA do tecido tumoral pelo Banco de Tumores do HC-Barretos.

4.4.2 Plasma

Um tubo de sangue total com EDTA e gel separador (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) foi coletado, por punção venosa, e enviado ao Laboratório de Virologia - LIM 52 do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, passando, em seguida, por centrifugação a 1.600 xg por 10 minutos, para obter a separação do plasma. O mesmo foi separado em alíquotas de um ml e armazenado a -80°C até a realização dos procedimentos laboratoriais.

4.4.3 Extração de ácido nucléico do tumor

A extração de DNA, a partir do fragmento de tumor, foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Biotecnologia do Brasil LTDA) ou o kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel GmbH&Co, Germany), segundo instruções dos fabricantes.

Em resumo, o fragmento de tecido foi cortado em pedaços menores, aos quais foram adicionados tampão de lise de tecido e proteinase K. A mistura foi incubada a 56°C até que ocorresse a lise total do tecido. Após a incubação, seguiu-se protocolo segundo instruções do fabricante. O DNA extraído das amostras foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific) no comprimento de onda 260nm e em seguida foi armazenado a -20°C.

4.4.4 Genotipagem do HPV do tumor

Inicialmente, foram utilizados os kits comerciais PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frikenhausen, Germany) e Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). Esses kits foram escolhidos por terem como alvo regiões diferentes do genoma do HPV, aumentando a probabilidade da detecção do vírus.

Amostras que apresentaram resultado HPV negativo em ambos os ensaios, ou resultados discrepantes para HPV-16 e 18, foram submetidas às reações de PCR tipo específico para esses genótipos de HPV[122].

4.4.4.1 PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frikenhausen, Germany)

O kit comercial PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Germany) foi utilizado segundo as instruções do fabricante. Este kit utiliza um conjunto de iniciadores que amplificam um fragmento de 350pb da região E1 do HPV.

O ensaio é dividido em quatro etapas: PCR, hibridização, lavagem e escaneamento.

Após o final do procedimento, o chip foi introduzido no equipamento CheckScanner™ para realização da etapa de leitura de fluorescência. O resultado foi avaliado e emitido automaticamente pelo programa CheckReport™.

4.4.4.2 Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA)

Este kit comercial utiliza o conjunto de iniciadores PGMY09/11biotinilados, capaz de amplificar um fragmento de 450pb da região L1 do HPV.

O ensaio pode ser dividido em quatro etapas: PCR, hibridização, lavagem e detecção. Este ensaio foi realizado segundo instruções do fabricante.

As tiras de genotipagem deste teste são revestidas com bandas de sondas para 37 tipos de HPV e para β-globina.

A identificação dos diferentes genótipos do HPV foi feita mediante leitura visual das linhas azuis que apareceram nas tiras, as quais foram comparadas com o padrão das linhas de referência fornecidas pelo fabricante.

4.4.4.3 PCR HPV tipo específico

Amostras que apresentaram resultado discordante entre PapilloCheck® e Linear Array HPV Genotyping Test para HPV-16 e 18 foram submetidas à PCRs HPV tipo específico para confirmação do resultado da genotipagem, assim como, amostras HPV negativas no PapilloCheck® e no Linear Array HPV Genotyping Test.

Para a realização dessas reações utilizou-se iniciadores capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 100pb da região E7 do HPV (HPV-16 com 107pb e HPV-18 com 103pb)[122] (Tabela 2).

Tabela 2 **–** Lista de iniciadores utilizados para amplificar por PCR parte da região E7 do HPV-16 e 18.

Iniciador	Sequência (5´- 3´)	Posição dos iniciadores (5´- 3´)	Posição de acordo com GenBank
HPV16E7.667 (Forward)	GATGAAATAGATGGTCCAGC	667 - 686	Seq. Qv13791 GenBank: HQ644270.1
HPV16E7.774 (Reverse)	GCTTTGTACGCACAACCGAAGC	774 - 753	Seq. Qv13791 GenBank: HQ644270.1
HVP18E7.696 (Forward)	AAGAAAACGATGAAATAGATGGA	696 - 718	Seq. CU8 GenBank: GQ180784.1
HPV18E7.799 (Reverse)	GGCTTCACACTTACAACACA	799 - 780	Seq. CU8 GenBank: GQ180784.1

Fonte: Adaptado de Walboomers et al., 1999[122].

A mistura da PCR foi composta por 20mM de Tris-HCl pH8,4 (Invitrogen, USA), 50mM de KCl (Invitrogen, USA), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen, USA), 200µM de dNTP mix (Invitrogen, USA), 400nM do iniciador forward e 400nM do iniciador reverse, 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), 5,7% de glicerol, 0,25µg/µL de Cresol Red e água DNAse RNAse free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído (50 a 1971,5 ng). A amplificação em termociclador

Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany) foi realizada segundo o protocolo: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto), e extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.4.4.3.1 Detecção do produto de PCR

Após a realização da PCR, os produtos amplificados (107pb para HPV-16 e 103pb para HPV-18) foram observados em gel de agarose a 1,5% (Agarose Ultrapure TM – Invitrogen Life Technologies) em tampão TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA)], corado com SYBR Safe™ 1X (Invitrogen, USA).

Os produtos da amplificação e o padrão de peso molecular de 100pb (Invitrogen, USA) foram aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 65 amperes por 30 minutos.

4.5 Padronização da reação de PCR em tempo real para detecção de HPV-16 e do HPV-18 no plasma

A tecnologia de PCR que foi utilizada neste estudo é o sistema TaqMan MGB®.

Para padronização da técnica da PCR em tempo real, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para a região do gene E7 do HPV-16 e HPV-18, que amplificam um fragmento de 107pb da região E7 do HPV-16 e 103pb da região E7

do HPV 18, segundo trabalho de Walboomers et al.[122]. Tabela 3, descrita anteriormente.

A sonda utilizada na reação para HPV-16, 5'-6FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGBNFQ-3', foi marcada com FAM® (6-Carboxifluoresceína) como *reporter* na porção terminal 5' e com MGB (Minor Groove Binder) na porção 3' e a sonda para HPV-18', 5'-VIC-AATCATCAACATTTACCAGCC-MGBNFQ-3', foi marcada com VIC® como *reporter* na porção terminal 5' e com MGB na porção 3'. Optou-se pela utilização de sonda MGB porque esta modificação permite aumentar a temperatura de *melting* (Tm), sem aumentar o tamanho da sonda, permitindo o desenho de sondas menores. Além disso, a presença de um *quencher* não fluorescente na extremidade 3' da sonda permite ao sistema medir a fluorescência do *reporter* com maior precisão (Tabela 3).

Tabela 3 – Lista de sondas utilizadas para amplificar por PCR em tempo Real na região E7 do HPV-16 e 18.

Sonda	**Sequência (5´- 3´)**	**Posição das sondas (5´- 3´)**	**Posição de acordo com GenBank**
HPV16 E7	6FAM - CAAGCAGAACCGGACAG-MGBNFQ	691 - 707	Seq. Z032 GenBank:HQ644297.1
HPV18 E7	VIC-AATCATCAACATTTACCAGCC-MGBNFQ	722 - 742	Seq. Qv02876 GenBank:EF202151.1

As sondas MGB foram desenhadas a partir da inspeção visual do alinhamento de seqüências consenso da região E7 do HPV-16 e do HPV-18, geradas a partir do alinhamento de 99 seqüências de HPV-16 e 26 seqüências de

HPV-18 obtidas no GenBank. Os alinhamentos foram gerados pelo software Clustal W, implementado no programa BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/ BioEdit.html). Figuras 6 e 7, 8 e 9. As sondas MGB também foram alinhadas com seqüências consenso da região E7 de outros tipos de HPVs (Anexo A).

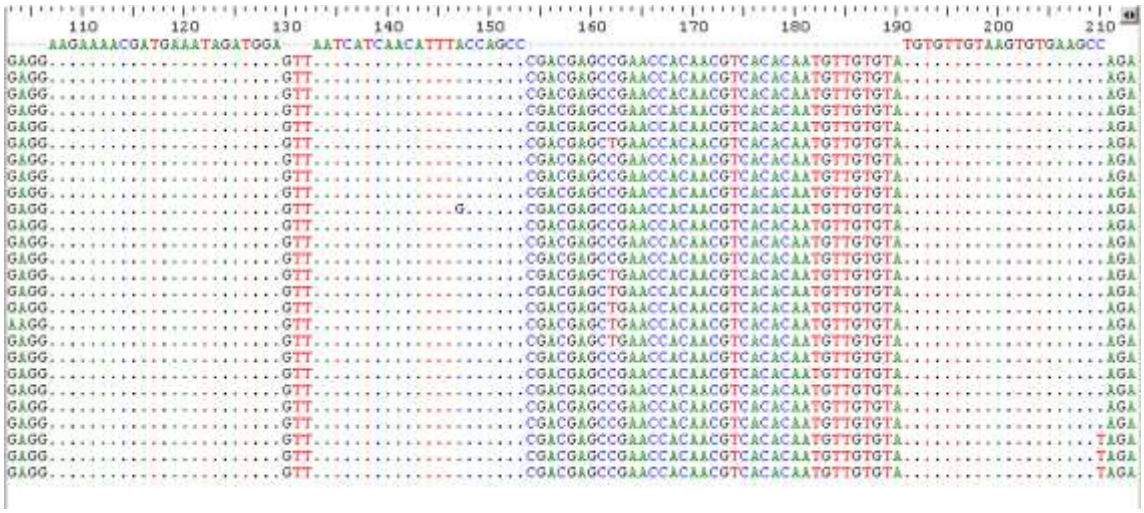


Figura 6 – Alinhamento do primer Foward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-18 com sequências de HPV-18 do GenBank.

Figura 7 – Alinhamento do primer Foward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank.

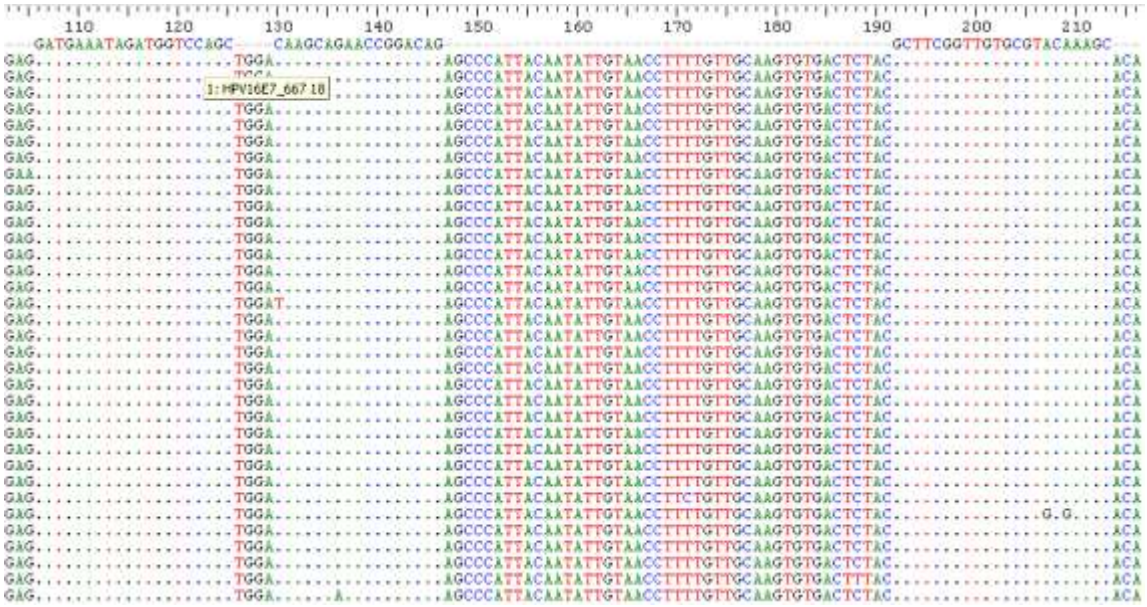


Figura 8 – Alinhamento do primer Foward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank.

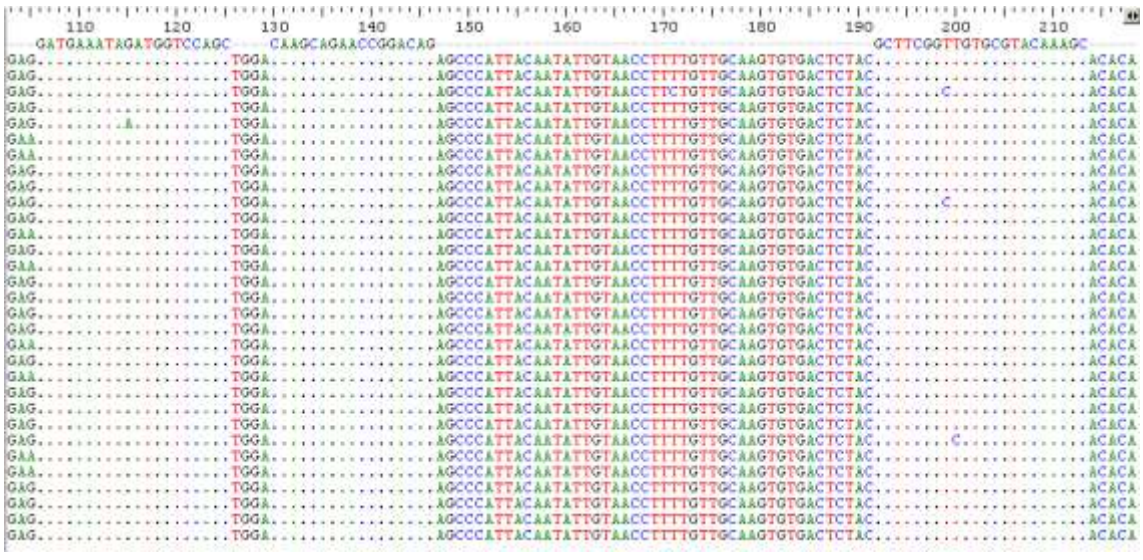


Figura 9 – Alinhamento do primer Foward, sonda e primer Reverse da região E7 de HPV-16 com sequências de HPV-16 do GenBank.

Como se vê no alinhamento da Figura 6, verificamos um mismatch de uma sequência de HPV 18 com a sonda HPV 18 E7 e nenhum mismatch com os iniciadores *forward* e *reverse.* No alinhamento das Figuras 7, 8 e 9 verificamos dois mismatches entre duas sequências de HPV 16 com a sonda HPV 16 E7 (um na posição 5' e outro no meio da sequência), um mismatch com o iniciador *forward* de HPV 16 com uma única sequência e três mismatches no iniciador *reverse* de HPV 16.

Para realização da padronização da reação foi utilizado DNA extraído de células Caski, correspondendo a 600 cópias do HPV-16/célula, gentilmente cedido pela Dra. Luisa Villa, do INCT - Instituto do HPV (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano) e DNA extraído de células HeLa, correspondendo a 20 cópias do HPV-18/célula, obtido no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

4.5.1 Determinação da temperatura de anelamento dos iniciadores

Para determinação da temperatura de anelamento dos iniciadores foram utilizados DNA extraído de CasKi (600 cópias do HPV-16/célula), SiHa (1 cópia de HPV-16/célula) e HeLa (20 cópias do HPV-18/célula) em PCR convencional.

A temperatura de anelamento dos iniciadores foi testada nas seguintes temperaturas: 40°C, 45,4°C, 50,7°C, 56°C e 59,8°C.

As reações para determinação da temperatura de anelamento e de iniciadores foram realizadas utilizando 20mM de Tris-HCl pH8,4 (Invitrogen, USA), 50mM de KCl (Invitrogen, USA), 1,5mM de $MgCl_2$ (Invitrogen, USA), 200µM de dNTP mix (Invitrogen, USA), 400nM do iniciador forward e do iniciador reverso, 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), 5,7% de glicerol,

0,25µg/µL de Cresol Red e água DNAse RNAse free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído.

A amplificação em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany) foi realizada segundo o protocolo: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de (94°C por 1 minuto, variando de 40°C a 59,8°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto), e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Após a realização da PCR, os produtos amplificados (107pb para HPV-16, 103pb para HPV-18) foram observados em gel de agarose a 1,5% (Agarose Ultrapure TM – Invitrogen Life Technologies) em tampão TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA)], corado com SYBR Safe™ 1X (Invitrogen, USA).

Os produtos da amplificação e o padrão de peso molecular de 100pb (Invitrogen, USA) foram aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 65 amperes por 30 minutos.

4.5.2 Adequação à reação de PCR em tempo real TaqMan®

Após a determinação, por PCR convencional, da temperatura de anelamento ideal, testou-se a reação no sistema de PCR em tempo real TaqMan®, com três concentrações finais de iniciadores: 100nM, 200nM e 400nM, a fim de verificar qual dessas concentrações apresentava melhor sensibilidade e especificidade.

Todas as reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no instrumento ABI Prism® 7300 HT SDS (Applied Biosystems, Inc., EUA).

A reação foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 100nM, 200nM e 400nM de iniciadores de HPV-16 E7 e HPV-18 E7, em reações separadas para cada tipo, e água DNAse RNAse free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído de células Caski, SiHa e HeLa. A amplificação foi realizada segundo o protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de (95°C por 15 segundos, 52°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto).

Após a realização da PCR, os produtos amplificados (107pb e 103pb da região E7 do HPV-16 e 18, respectivamente) foram visualizados em gel de agarose a 1,5% (Agarose Ultrapure TM – Invitrogen Life Technologies) em tampão TAE 1X [DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris-Acetato e 50mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA)], corado com SYBR Safe™ 1X (Invitrogen, USA).

Os produtos da amplificação e o padrão de tamanho molecular de 100pb (Invitrogen, USA) foram aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 65 amperes por 30 minutos.

4.5.3 Determinação da concentração final das sondas

Após obter a temperatura de anelamento e a concentração final de iniciadores no sistema TaqMan®, iniciou-se a etapa de padronização da concentração de sonda.

Foram testadas três concentrações de sonda: 200nM, 400nM e 600nM.

Esta última etapa da padronização foi realizada para otimização da técnica, ou seja, identificação do menor Ct (cycle threshold) e a maior medida de fluorescência (ΔRn), utilizando a menor concentração de sonda possível.

A reação foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 400nM da mistura de iniciadores HPV-16 E7 e HPV-18 E7, 200nM, 400nM e 600nM de sonda e água DNAse RNAse free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde foram utilizados 5µL de DNA extraído de células Caski e HeLa.

4.5.4 Determinação da sensibilidade analítica

Para a determinação da sensibilidade analítica, seis réplicas de cada ponto da curva padrão foram submetidas ao ensaio padronizado. Para a construção das curvas padrão foram utilizados DNA extraído de Caski e HeLa, respectivamente.

Para a construção da curva padrão para HPV-16 foi utilizado DNA extraído de células Caski na concentração de 50 ng/µL. Inicialmente, 10 µL do DNA extraído de células Caski (50 ng/µL) foram adicionados a 990 µL de plasma negativo (volume final de 1mL). Sabendo-se que 1 célula diplóide possui 6,6 pg de DNA e que a linhagem celular Caski possui 600 cópias de HPV-16/célula, sabemos que foram adicionados $4,5 \times 10^7$ cópias de HPV-16 em um volume final de 1 mL de plasma negativo. Posteriormente, diluições seriadas (1:10) foram realizadas até a concentração de $4,5 \times 10^1$ cópias de HPV-16.

Para a construção da curva padrão para a reação de detecção de HPV-18 foi adotado o mesmo procedimento. Inicialmente, 10 µL do DNA extraído de células HeLa, na concentração de 30ng/µL foram adicionados a 990 µL de plasma negativo (volume final de 1mL). Sabendo-se que uma célula diplóide possui 6,6 pg de DNA e

que a linhagem celular HeLa possui 20 cópias de HPV-18/célula, sabemos que foram adicionados 9,1 x 10^5 cópias de HPV-18 em um volume final de 1 mL de plasma negativo. Posteriormente, diluições seriadas foram realizadas até a concentração de 9,1 x 10^1 cópias de HPV-18.

A sensibilidade analítica foi determinada por análise Probit dos resultados obtidos. O último ponto da curva da reação de HPV-16 que amplificou foi de 4,5 x 10^2 cópias/mL (Ct = 35°C) e o último ponto da curva da reação de HPV-18 foi de 9,1 x 10^3 cópias/mL (Ct = 36°C).

4.5.5 Determinação da especificidade analítica

Para a determinação da especificidade analítica da reação de PCR em tempo real padronizada, os DNAs extraídos das amostras de tumores, que continham diferentes tipos de HPV, foram submetidos à reação tipo-específica para HPV-16 e para HPV-18. A especificidade da reação foi verificada testando-se DNA dos HPVs-16, 18, 31, 33, 35, 45, 58, 39, 73, 68, 6, 11, 42, 44 e 51.

4.6 Detecção e quantificação de HPV-16 e HPV-18 nas amostras de plasma de mulheres com câncer de colo do útero e pós-tratamento

4.6.1 Preparo das amostras pré-extração de ácido nucléico

Os plasmas separados em alíquotas de um ml e estocados a -80°C foram descongelados e passaram por uma segunda centrifugação de alta velocidade de

16.000 xg por 10 minutos a 4°C para eliminação de restos celulares, sempre antes da extração[123].

4.6.2 Extração de ácidos nucléicos

As amostras de plasma das pacientes provenientes do ICESP ou do HC-Barretos que apresentaram HPV-16 e/ou 18 no tecido tumoral foram selecionadas para detecção e quantificação de HPV-16 e/ou 18 utilizando a reação de PCR em tempo real padronizada neste estudo.

Após o preparo inicial de centrifugação para eliminação de restos celulares, forma-se um pellet no fundo do tubo cônico e duas alíquotas de 400µL de sobrenadante foram coletadas e transferidas cada uma para um tubo individual de amostra. Todos os tubos foram devidamente identificados.

A extração do DNA livre-circulante no plasma foi realizada com equipamento de extração automatizado iPrep Purification Instrument e o kit iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen, Life Techonogies, USA) ideal para purificação de ácidos nucléicos virais de amostras livres de células (plasma, soro e urina) frescas ou descongeladas. A extração partiu-se sempre de 400µl de plasma, extraíndo duas vezes (duas alíquotas de 400µl). O DNA foi eluído em 50µl de tampão de eluição do sistema iPrep PureLink Virus Kit (Invitrogen, Life Techonogies, USA).

O iPrep PureLink Virus kit é baseado em purificação por beads magnéticas monodispersas de 1µm (Dynabeads® MyOne™ SILANE) com uma área de superfície altamente específica e optimizado por sílica. O uso de beads magnéticas permite uma purificação sem a necessidade do uso de centrífugas ou vácuo e a automatização permite uma purificação mais rápida (40 minutos), evitando erros de pipetagem e contaminação por manipulação.

As partículas virais são lisadas pelo buffer de lise e as proteínas são digeridas com Proteinase K. O lisado é misturado com Dynabeads® MyOne™ SILANE para subsequente ligação dos ácidos nucléicos às beads magnéticas. A ligação ácidos nucléicos + beads magnéticas é separada do lisado usando separação magnética. As beads são completamente lavadas com buffers de lavagem para remover as impurezas. O RNA/DNA é eluido finalmente com o buffer de eluição.

4.6.3 PCR em Tempo Real das amostras de plasma

Para determinar se as amostras de plasma foram positivas para presença de DNA de HPV realizou-se a PCR em tempo real quantitativa padronizada para cada tipo de HPV (16 e 18). Dessa forma foi necessária a construção de uma curva padrão em cada placa de reação, que serviu de parâmetro para a quantificação das amostras a serem testadas. Portanto, foram construídas duas curvas padrão: uma para a reação de detecção de HPV-16 e outra para a reação de detecção de HPV-18, já citadas anteriormente. Todas as reações foram realizadas em triplicata para as duas alíquotas extraídas de cada amostra.

4.7 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi avaliada em conjunto com as características clínicas das pacientes no momento do diagnóstico, juntamente com a evolução clínica pós-terapia, ou seja, avaliou-se o resultado do teste (HPV DNA plasmático positivo ou negativo) no pré-tratamento e pós-tratamento em relação à recidiva da

doença (sim ou não), estadio inicial da doença, ao tipo histológico, ao tipo de tratamento, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

As variáveis categóricas são apresentadas em frequências e porcentagens, para as variáveis contínuas os valores de média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo foram calculados.

Para avaliar associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher.

Análise de sobrevida foi utilizada para avaliar associação entre o DNA do HPV no plasma e o tempo até o óbito (sobrevida global) ou até a recidiva ou persistência da doença (sobrevida livre de doença). As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste log-rank.

Na análise da sobrevida global, o evento “falha” foi o óbito pelo câncer ou outra causa, pacientes vivas ou perdidas de seguimento até o final do período de estudo foram consideradas como “censura”. No caso da sobrevida livre de doença, o tempo, as pacientes que tiveram recidivas foram consideradas como “falha”, outras situações foram consideradas como “censura”.

Concordância entre a o DNA no plasma pré e pós-tratamento foi medido pelo coeficiente Kappa.

A determinação da sensibilidade analítica para o teste de PCR em Tempo Real para HPV-16 e 18 foi realizada pelo modelo Probit com intervalos com 95% de confiança.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SPSS for Windows v.18. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 População estudada

Do total de 203 pacientes em que foi possível coletar amostras de tumor, 177 tiveram confirmação histológica por anátomo-patológico como sendo carcinoma epidermóide cervical (CEC) ou adenocarcinoma (ADC). As amostras nas quais o exame anátomo-patológico não confirmou o diagnóstico inicial de câncer cervical (26 amostras) foram excluídas deste estudo (por exemplo: NIC I, NIC II ou NIC III, ausência de neoplasia residual em colo uterino, carcinossarcoma, carcinoma endometrial, adenocarcinoma endometrial, carcinoma in situ de células escamosas, cervicite crônica).

5.2 Determinação final do genótipo do HPV presente no tecido tumoral

A detecção e genotipagem do HPV presente no fragmento de tumor obtido das pacientes do estudo foi realizada através da comparação entre os ensaios dos testes PapilloCheck®, Linear Array HPV Genotyping Test (LA) e PCR HPV tipo específico para HPV-16 e HPV-18. Caso houvesse discordância entre os dois primeiros ensaios, a confirmação foi feita pelo PCR HPV tipo específico. Só entraram no estudo aquelas que foram positivas para HPV-16 e/ou HPV-18.

A partir das 177 amostras selecionadas com confirmação anátomo-patológica de CEC ou ADC, 144 foram positivas no tumor para HPV 16 e/ou 18, sendo: HPV 16 = 88,2% (127/144), HPV 18 = 8,3% (12/144), HPV 16 e 18 = 3,5% (5/144), pelas técnicas acima descritas. Como alguns plasmas de pré e pós-tratamento não

estavam disponíveis, seja porque havia acabado o plasma para a extração ou porque não foi coletado, sete pacientes foram excluídas do estudo. Outros fatores que impossibilitaram a coleta de amostras de pós-tratamento foram: óbito ou desistência do tratamento.

Assim, seguiram para o estudo da análise de DNA de HPV, no plasma pré ou pós-tratamento, 137 pacientes. O estudo foi então divido em duas partes: a análise de amostras de pré-tratamento e pós-tratamento. A coleta das informações foi completada em 20 de março de 2015.

Não foi possível incluir novas pacientes para atingir o N amostral por uma questão de tempo para acompanhamento das pacientes e conclusão do estudo.

Das 137 amostras positivas para HPV 16 e/ou 18 no tumor, 120 amostras foram positivas para HPV-16 (87,6%), 12 positivas para HPV-18 (8,8%) e cinco positivas para HPV-16 e 18 (3,6%). Para as 53 amostras do ICESP temos: 43 amostras positivas para HPV-16 (81,1%), nove positivas para HPV-18 (17,0%) e uma positiva para HPV-16 e 18 (1,9%). Para as 84 amostras de Barretos temos: 77 amostras positivas para HPV-16 (91,7%), três positivas para HPV-18 (3,6%) e quatro positivas para HPV-16 e 18 (4,8%).

Das 110 amostras que entraram para o estudo de seguimento pós-tratamento do câncer cervical temos: 98 amostras foram positivas para HPV-16 (89,1%), oito positivas para HPV-18 (7,3%) e quatro positivas para HPV-16 e 18 (3,6%). Para as 39 amostras do ICESP temos: 33 amostras positivas para HPV-16 (84,6%), cinco positivas para HPV-18 (12,8%) e uma positiva para HPV-16 e 18 (2,6%). Para as 71 amostras de Barretos temos: 65 amostras positivas para HPV-16 (91,5%), três positivas para HPV-18 (4,2%) e três positivas para HPV-16 e 18 (4,2%).

Considerando-se as informações das 137 pacientes do estudo, 47 (34,3%) pacientes foram a óbito, sendo 29 confirmada como causa o câncer cervical, 48 apresentaram recidiva ou persistência da doença (35,0%), 11 (8,0%) estavam vivas

em seguimento da recidiva, 60 (43,5%) estavam vivas até o fim da coleta de informações e 30 (21,9%) não tinham informações a respeito da sobrevida da paciente. A duração do seguimento variou de 0 a 1682 dias (4,7 anos).

A média da sobrevida global foi de 1672,23 dias (1434,36 - 1910,12) e mediana foi de 1521,0 dias. A média e mediana da sobrevida em relação ao tipo de HPV foi de: HPV 16 – 1682,7 e 1521,0 dias, HPV 18 – 1079,83 e 584,0 dias, respectivamente, e HPV 16/18 – 1265,0 (não tem cálculo de mediana HPV 16/18, pois só houve um único óbito). A sobrevida global é calculada a partir da data do diagnóstico do câncer até o último evento, ou seja, data do óbito, data da última informação ou último seguimento.

5.3 Características da população na análise pré-tratamento

Para a análise da presença de DNA de HPV em amostras de tumor e plasma obtidas na data do diagnóstico e antes do tratamento foram incluídas 131 pacientes (137 pacientes HPV positivas no tumor, menos 6 pacientes que não tiveram o plasma pré-tratamento disponível ou sem volume suficiente para a extração do DNA), sendo 50 oriundas do ICESP e 81 do Hospital de Câncer de Barretos.

A média de idade das pacientes deste estudo foi de 52,5 anos (variando de 21 a 86 anos). As pacientes atendidas no ICESP apresentaram média de idade de 52,5 anos. Das pacientes atendidas no ICESP (21 a 84 anos), três (6,0%) tinham menos de 30 anos de idade. As pacientes de Barretos apresentaram média de idade de 53,4 anos. Das pacientes atendidas no Hospital de Câncer de Barretos (31 a 86 anos), todas estavam acima dos 31 anos de idade.

O tipo histológico do tumor foi definido por exame anátomo-patológico e obtido através de revisão do prontuário médico. Vinte e quatro pacientes (18,3%)

apresentavam adenocarcinoma (ADC) e 107 (81,7%) carcinoma de células escamosas (CEC). A freqüência de ADC no ICESP foi de 18,0%, no HC-Barretos foi de 18,5%. A freqüência de CEC no ICESP foi de 82,0%, no HC-Barretos foi de 81,5%.

Em relação ao estadiamento clínico, segundo FIGO temos 130 pacientes: três casos (2,3%) classificados como estadio IA, 19 (14,5%) IB, nove (6,9%) IB2, sete (5,3%) IIA, 54 (41,2%) IIB-IIB2, sete (5,3%) IIIA, 17 (13,0%) IIIB, um (0,8%) IIIC e nove (6,9%) IVA, quatro (3,1) IVB e um (0,8) sem estadiamento, pois foi a óbito antes da classificação. Para as pacientes do ICESP, temos dois casos (4,0%) classificados como estadio IA, sete (14,0%) IB, sete (14,0%) IB2, quatro (8,0%) IIA, 15 (30,0%) IIB-IIB2, quatro (8,0%) IIIA, seis (12,0%) IIIB e cinco (10,0%) IV-IVA. Para Barretos temos um caso (1,2%) classificado como estadio IA, 12 (14,8%) IB-IB1, dois (2,5%) IB2, três (3,8%) IIA, 39 (48,8%) IIB-IIB2, três (3,8%) IIIA, 11 (13,8%) IIIB, um (1,25%) IIIC e quatro (4,9%) IVA, quatro (4,9%) IVB e um (1,2%) sem estadiamento, pois foi a óbito antes da classificação. Os dados estão resumidos na Tabela 4.

Os tipos de tratamento para câncer cervical, aos quais as 137 pacientes do estudo foram submetidas, são: cirurgia, quimioterapia e radioterapia, podendo ser combinados entre si. Passaram por: somente cirurgia, 10 pacientes (7,3%); somente radioterapia, 18 (13,1%); somente quimioterapia, duas (1,5%); quimioterapia + radioterapia, 77 (56,2%); cirurgia + radioterapia, cinco (3,7%) e cirurgia + quimioterapia + radioterapia, 21 (15,3%). Das quatro pacientes que não passaram por tratamento, de duas não havia informação e duas foram a óbito antes de iniciar o tratamento.

Tabela 4 - Características da população com análise de DNA no plasma pré-tratamento.

Características da população com análise de DNA no plasma pré-tratamento		
N (total)	131	
N com recidiva	34	
N com persistência da doença	6	
N sem recidiva/persistência	89	
N s/info-recidiva	2	
Idade média (variação)	52,5 (21-86) anos	
	N	%
Tipo de HPV		
HPV 16	114	87,0
HPV 18	12	9,2
HPV 16 e 18	5	3,8
Estadio FIGO		
IA-IA1	3	2,3
IB-IB1	19	14,5
IB2	9	6,9
IIA-IIA1	7	5,3
IIB-IIB2	54	41,2
IIIA	7	5,3
IIIB	17	13,0
IIIC	1	0,8
IVA	9	6,9
IVB	4	3,1
s/estadio	1	0,8
Tipo Histológico		
CEC	107	81,7
ADC	24	18,3
Tratamento primário		
Cirurgia	9	6,9
Quimioterapia	2	1,5
Radioterapia	18	13,7
Cirurgia + Quimioterapia + Radioterapia	21	16,0
Quimioterapia + Radioterapia	73	55,7
Cirurgia + Radioterapia	4	3,1
Nenhum	4	3,1
DNA HPV no plasma		
Positivo	77	58,8
Negativo	54	41,2

*o estadiamento era desconhecido em um caso

5.4 Características da população na análise pós-tratamento

Seguiram para análise da presença de DNA de HPV em amostras de plasma, após o tratamento completo do câncer cervical, 110 pacientes. Das 137 pacientes selecionas para este estudo, em 22 pacientes não foi possível a coleta de nenhuma amostra pós-tratamento (motivos como desistência do tratamento, não comparecimento à visita na data agendada, perda de seguimento da paciente, retorno à cidade natal) e cinco pacientes faleceram antes do início do tratamento, ou antes do início das coletas de seguimento. Das pacientes que foram a óbito, duas faleceram antes do início ou término do tratamento, duas pacientes vieram a óbito após a primeira coleta do pós-tratamento e uma não teve nenhuma coleta no pós-tratamento antecedendo o óbito.

Das 110 pacientes que seguiram no estudo para a detecção de DNA de HPV no plasma pós-tratamento, 39 são provenientes do ICESP e 71 provenientes do Hospital de Câncer de Barretos.

A média de idade das pacientes que entraram na análise de pós-tratamento foi de 53,0 anos (variando de 21 a 86 anos). As pacientes atendidas no ICESP apresentaram média de idade de 53,0 anos (21 a 83 anos). As pacientes de Barretos apresentaram média de idade de 54,0 anos (31 a 86 anos).

O tipo histológico do tumor foi definido por exame anátomo-patológico e obtido através de revisão do prontuário médico. Dezenove (17,3%) apresentavam adenocarcinoma (ADC) e 91 (82,7%) carcinoma de células escamosas (CEC). A freqüência de ADC no ICESP foi de 17,9%, no HC-Barretos foi de 16,6%. A freqüência de CEC no ICESP foi de 82,1%, no HC-Barretos foi de 83,3%.

Em relação ao estadiamento clínico segundo FIGO temos: três casos (2,7%) classificados como estadio IA, 26 (23,6%) IB, cinco (4,5%) IIA, 48 (43,6%) IIB, cinco (4,5%) IIIA, 14 (12,7%) IIIB e 9 (8,2%) IV. Para as pacientes do ICESP temos dois

casos (5,1%) classificados como estadio IA, 11 (28,2%) IB, três (7,7%) IIA, 13 (33,3%) IIB, três (7,7%) IIIA, três (7,7%) IIIB e quatro (10,3%) IV. Para Barretos temos um caso (1,4%) classificado como estadio IA, 15 (21,1%) IB, dois (2,8%) IIA, 35 (49,3%) IIB, dois (2,8%) IIIA, 11 (15,5%) IIIB e cinco (7,0%) IV.

As amostras de pós-tratamento foram coletadas respeitando-se a agenda de seguimento de cada paciente, por isso houve uma variação dos meses coletados (podendo ser de dois em dois meses, três em três, ou quatro em quatro meses no primeiro ano de seguimento), mas para facilitar o estudo, estabeleceram-se coletas a cada três meses no primeiro ano, de seis em seis meses no segundo e terceiro ano. No total foram 131 amostras de tumor e plasma coletadas no pré-tratamento e 370 amostras após o término do tratamento (seis pacientes não tiveram amostra de plasma de pré-tratamento disponível), sendo uma média de três coletas pós-tratamento por paciente do estudo. O número de amostras coletadas no pós-tratamento estão especificadas na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Quantidade de amostras coletadas pré e pós-tratamento e tempo de coleta.

	Pré-tratamento V1	V2 (após 3 meses)	V3 (após 6 meses)	V4 (após 9 meses)	V5 (após 12 meses)
Número de amostras coletadas	131	83	74	72	61

	V6 (após 18 meses)	V7 (após 24 meses	V8 (após 30 meses)	V9 (após 36 meses)	V10 (após 42 meses)
Número de amostras coletadas	29	17	18	11	5

5.5 Padronização da reação de PCR em tempo real para detecção de HPV-16 e HPV-18 no plasma

A padronização da Reação de PCR em tempo real específica para HPV-16 e 18 teve início com a determinação da temperatura de anelamento. Foram testadas cinco diferentes temperaturas de anelamento: 40°C, 45,4°C, 50,7°C, 56°C e 59,8°C, em PCR convencional.

Observou-se que o melhor resultado obtido foi com as temperaturas de anelamento entre 50°C e 56°C. Então optou-se por manter a temperatura a 55°C. A concentração final ideal de iniciadores foi de 400nM.

Em seguida, testou-se a reação no sistema de PCR em tempo real TaqMan®, utilizando 55°C de temperatura de anelamento de iniciadores e 400nM de concentração final de iniciadores. A princípio, o objetivo inicial era ter um protocolo de amplificação único que servisse para os dois tipos de HPV, ou seja, a mesma ciclagem para ambos os tipos de HPV. Observou-se que a reação comportou-se de maneira satisfatória, para ensaio de PCR em tempo real, específica para ambos HPVs. Em seguida testamos as temperaturas de anelamento de 50°C, 55°C e 60°C para os dois tipos, HPV-16 e HPV-18. Verificamos ao final que a temperatura de anelamento que apresentou melhor resultado (menor Ct) para HPV-16 foi a de 55°C e para HPV-18 foi a de 50°C.

Posteriormente, testou-se a concentração final de iniciadores ideal no sistema de PCR em tempo real TaqMan®. Foram testadas três concentrações de iniciadores: 100nM, 200nM e 400nM. A concentração considerada ideal foi a de 400nM.

Por fim, iniciou-se a etapa de padronização da concentração de sonda com concentração de iniciadores constante (400nM). Foram testadas três concentrações de sonda: 200nM, 400nM e 600nM. Observou-se que as concentrações ideais de

sonda MGB no sistema TaqMan® para as reações de HPV-16 e 18 eram diferentes.

Assim, para a reação de amplificação ideal do sistema TaqMan® do HPV-16 verificamos que a melhor concentração da sonda MGB HPV 16 E7 foi a de 200nM e temperatura de anelamento de 55°C e para a reação de amplificação do HPV-18 verificamos que a melhor concentração da sonda MGB HPV 18 E7 foi a de 400nM e temperatura de anelamento de 50°C.

A ciclagem das reações consiste em: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C ou 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto.

5.5.1 Determinação da sensibilidade analítica

Após as condições das reações terem sido determinadas, verificou-se o limite de detecção das mesmas. O ensaio foi realizado utilizando DNA extraído de células Caski e HeLa que foram analisados em 10 réplicas para cada ponto da diluição seriada (cinco réplicas de cada uma das duas extrações dos pontos da curva), variando de $4,5 \times 10^7$ a $4,5 \times 10^1$ cópias de HPV-16/mL no plasma e de $9,1 \times 10^5$ a $9,1 \times 10^1$ cópias de HPV-18/mL no plasma (Figuras 10 e 11).

A sensibilidade analítica das reações foi determinada por análise Probit, para estabelecer o limite de detecção, considerando-se um intervalo de confiança de 95%. A sensibilidade do teste para HPV-16 foi de 8.121,8 cópias de HPV 16/mL (valor mínimo de 3.627,4 cópias/mL e máximo de 91.672,0 cópias/mL) e para HPV-18 foi de 6.686,4 cópias de HPV 18/mL (valor mínimo de 4.057,9 cópias/mL e máximo de 22.619,5 cópias/mL).

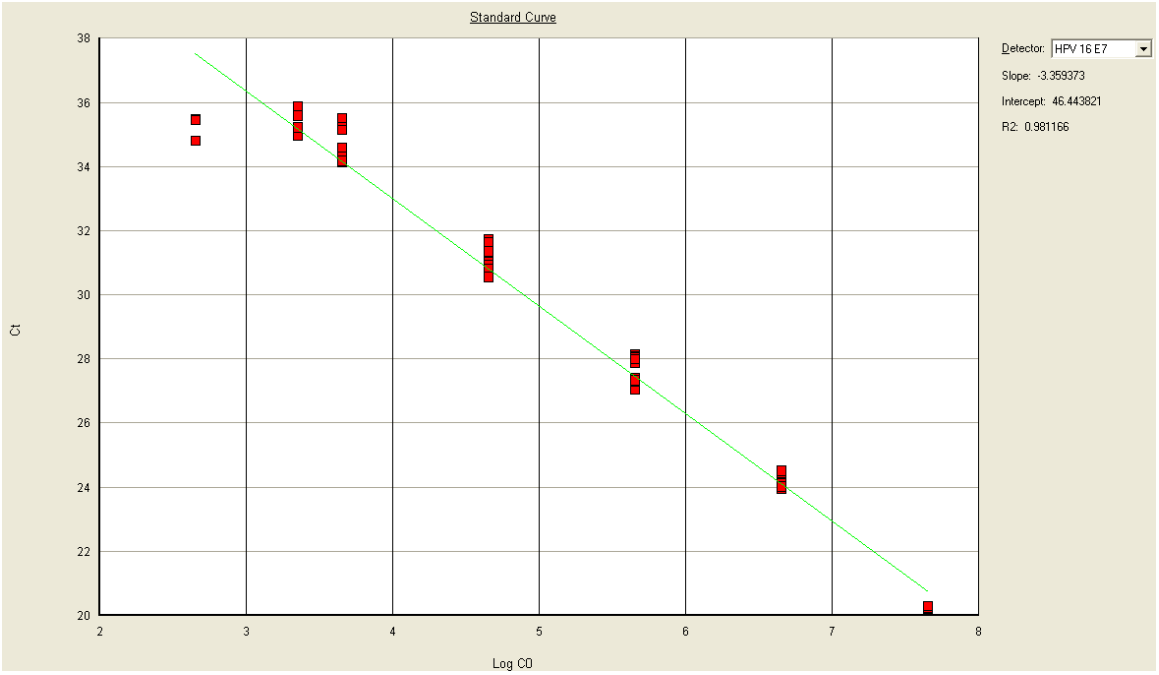


Figura 10 – Reta obtida através dos pontos da curva padrão da PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 16 para análise de Probit.

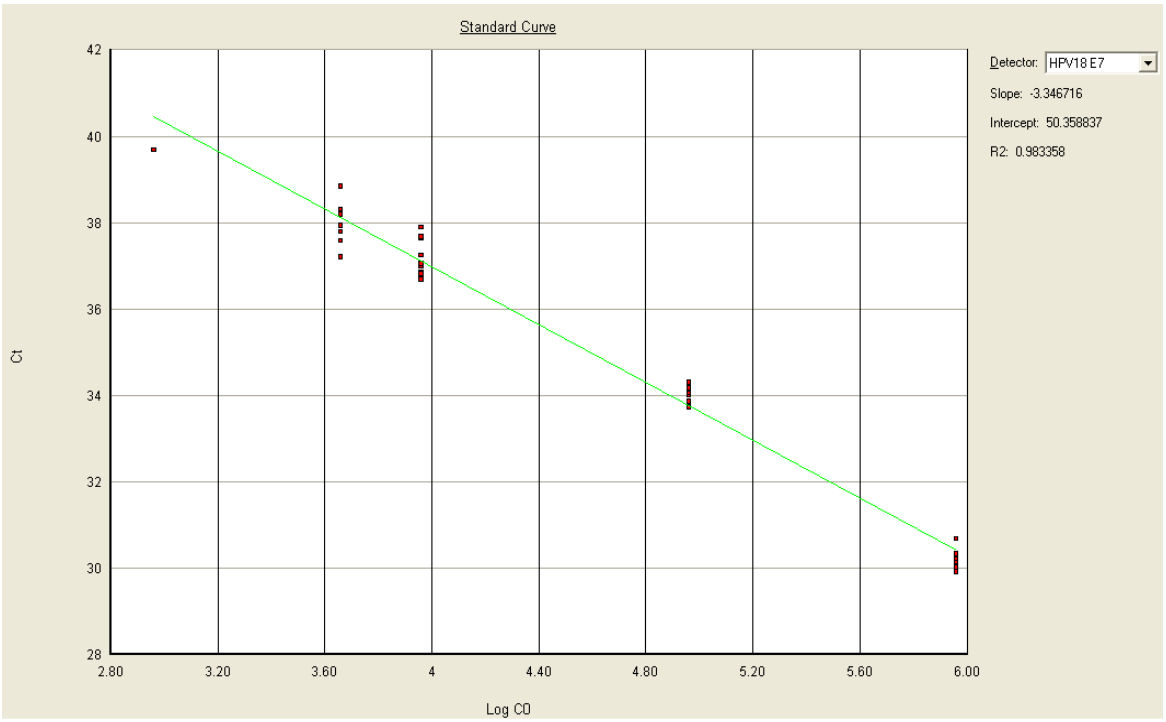


Figura 11 – Reta obtida através dos pontos da curva padrão da PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 18 para análise de Probit.

5.5.2 Determinação da especificidade analítica

Para concluir a padronização da reação, a especificidade analítica da reação de PCR em tempo real padronizada para HPV-16 e HPV-18 foi testada com DNAs extraídos das amostras de tumores, que continham diferentes tipos de HPVs (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 58, 39, 73, 68, 6, 11, 42, 44 e 51) e com DNAs extraídos do plasma de gestantes.

5.5.2.1 Plasma de gestantes

O primeiro teste foi realizado com 20 amostras de DNA extraído do plasma de gestantes saudáveis, nas quais se espera não detectar a presença do DNA desses vírus. Neste teste, todas as amostras foram negativas na reação de PCR em Tempo Real, tanto para HPV 16 como para HPV 18 (Figuras 12 e 13).

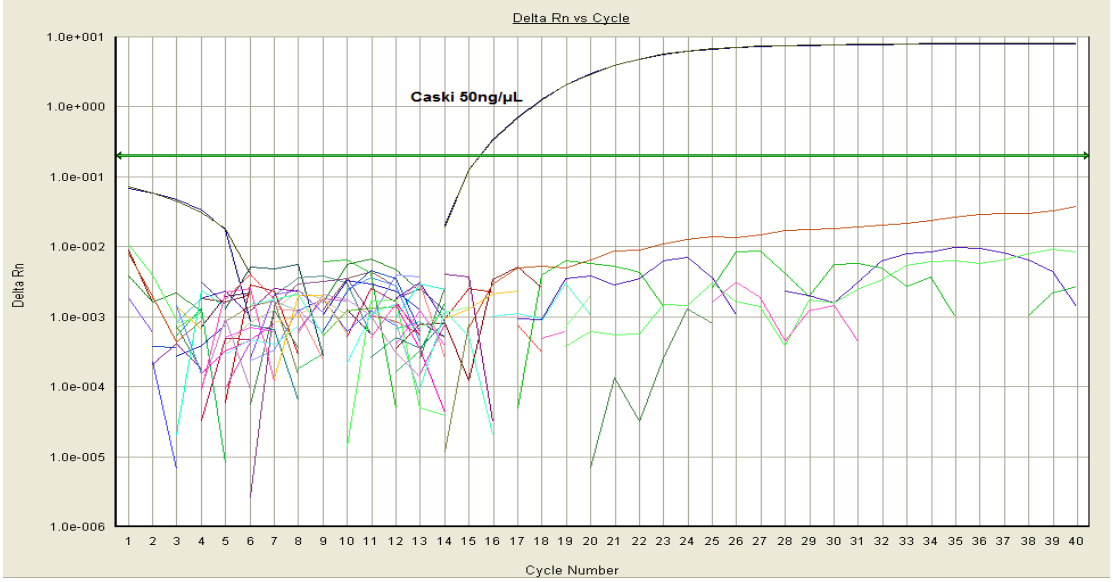


Figura 12 – Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 16 para teste de especificidade com plasma de gestantes.

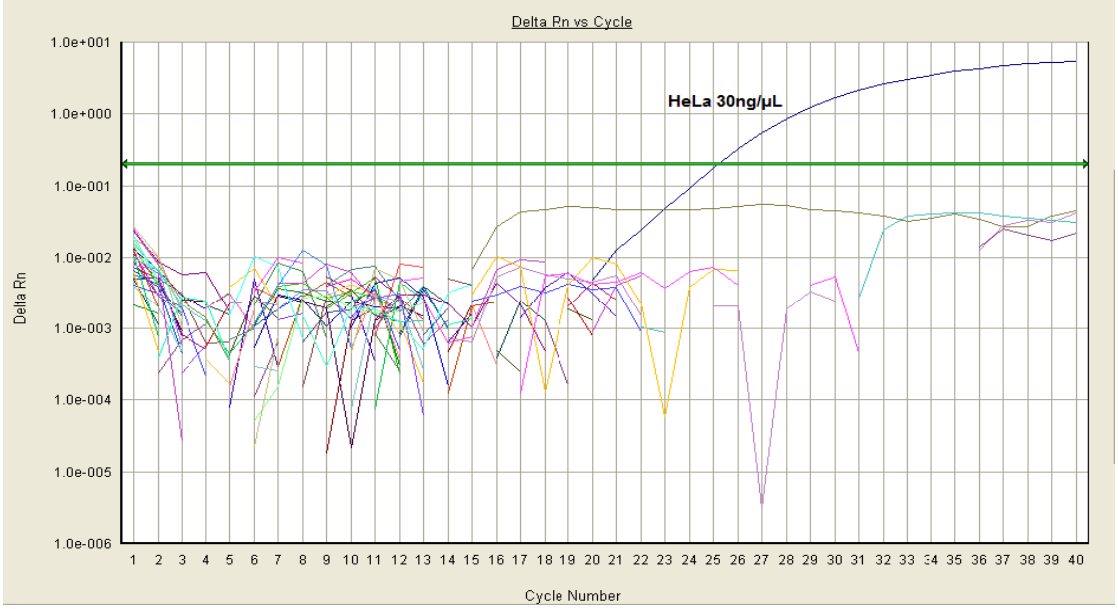


Figura 13 – Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 18 para teste de especificidade com plasma de gestantes.

5.5.2.2 DNA de HPV extraído de tumor

O segundo teste foi realizado com os DNAs de HPV extraídos de tumores, todos a uma concentração entre 50ng/µL ou menor, água (controle negativo), DNA extraído de células Caski e Hela (controles positivos de cada reação) e plasma negativo (controle da extração). Neste teste, algumas amostras contendo HPV de outros tipos que não o HPV 16 e 18 amplificaram (HPV – 31, 33, 35, 39, 45, 52, 73, 6), mesmo que em Cts mais altos, na reação de PCR em Tempo Real para HPV-16.

A reação de PCR em Tempo Real para HPV 18 não amplificou nenhum dos outros tipos de HPV.

A fim de melhorar a especificidade da reação de HPV-16 foram feitos alguns testes. Em todos os testes foram colocados todos os pontos da curva, água, controle positivo e plasma negativo.

1° teste: Primeiro mudou-se a temperatura de anelamento. Retirou-se a temperatura de anelamento de 55°C, na reação de PCR em Tempo Real para HPV-16 e passou-se diretamente para 60°C a fim de tentar melhorar a especificidade de hibridização da sonda e iniciadores, sem com isso perder a sensibilidade. Porém, obteve-se um leve aumento no Ct e algumas amostras continuaram a amplificar, sem alterar os Cts dos pontos da curva.

2° teste: Manteve-se a mesma alteração (retirada da temperatura de anelamento, 55°C) e diluiu-se todas as amostras a 5ng/uL. As amostras de HPV de outros tipos, que não HPV-16, tiveram um aumento no Ct de amplificação, por exemplo, uma amostra HPV-33 passou do Ct 29 para o Ct 32 ou HPV-39 do Ct 33 para Ct 36, porém, as amostras continuavam a amplificar.

3° teste: Tentou-se então um teste Touchdown PCR em tempo real que parte de temperaturas mais altas, a fim de tentar melhorar a especificidade de hibridização da sonda e iniciadores. Os 40 ciclos da reação foram divididos em duas partes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 15 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 1 minuto + 25 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, com todas as amostras na concentração de 5ng/uL. Neste teste amplificou-se apenas HVP-16 (Caski e amostra de tumor), porém perdeu-se a sensibilidade (o limite detecção passou de $4,5 \times 10^2$ cópias/mL para $4,5 \times 10^4$ cópias/mL).

4° teste: Foi realizado um teste Touchdown PCR em tempo real invertido, trocando-se as temperaturas de 60°C e 65°C. Os 40 ciclos da reação foram divididos em duas partes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 15 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto + 25 ciclos de 95°C por 15 segundos e 65°C por 1 minuto, com todas as amostras na concentração de 5ng/uL. Neste teste, também, amplificou-se apenas HVP-16 (Caski e amostra de tumor),

porém, perdeu-se mais ainda a sensibilidade (só amplificou os pontos 4,5 x 10^7 cópias/mL e 4,5 x 10^6 cópias/mL).

5° teste: Após verificar que em temperaturas mais altas houve uma melhora em relação a não amplificação dos outros tipos de HPV, foi testada a temperatura de anelamento de 62,5°C, usando as amostras na concentração de 50ng/uL. Neste teste somente dois tipos de HPV amplificaram, HPV 31 e 33, porém, perdeu-se na sensibilidade, pois os pontos da curva só amplificaram até 4,5 x 10^4 cópias/mL.

6° e 7° testes: Em uma reação, foi acrescentado glicerol a 5% e na outra foi acrescentado DMSO também a 5% ao mix da reação de PCR em Tempo Real com volume final de 25 µL, porém não houve mudanças significativas.

5.6 Determinação e quantificação de HPV-16 e HPV-18 no plasma de mulheres com câncer no colo do útero

Para determinar a presença de DNA de HPV no plasma descongelou-se uma alíquota de um mL, a qual foi centrifugada a 16.000xg por 10min para separação dos restos celulares e foram extraídos DNA de duas alíquotas de 400µL para cada amostra, pelo sistema iPrep (Invitrogen, USA). Posteriormente, a duplicata de cada extração foi submetida à reação de PCR em tempo real padronizada para detecção do DNA livre-circulante de HPV. Todas as amostras, pontos da curva e controles de extração (plasma negativo) foram pipetados em triplicata de cada uma das duas extrações, totalizando seis réplicas e os controles negativos (água) e controles positivos (Caski e Hela) foram pipetados em duplicata (Figuras 14 e 15).

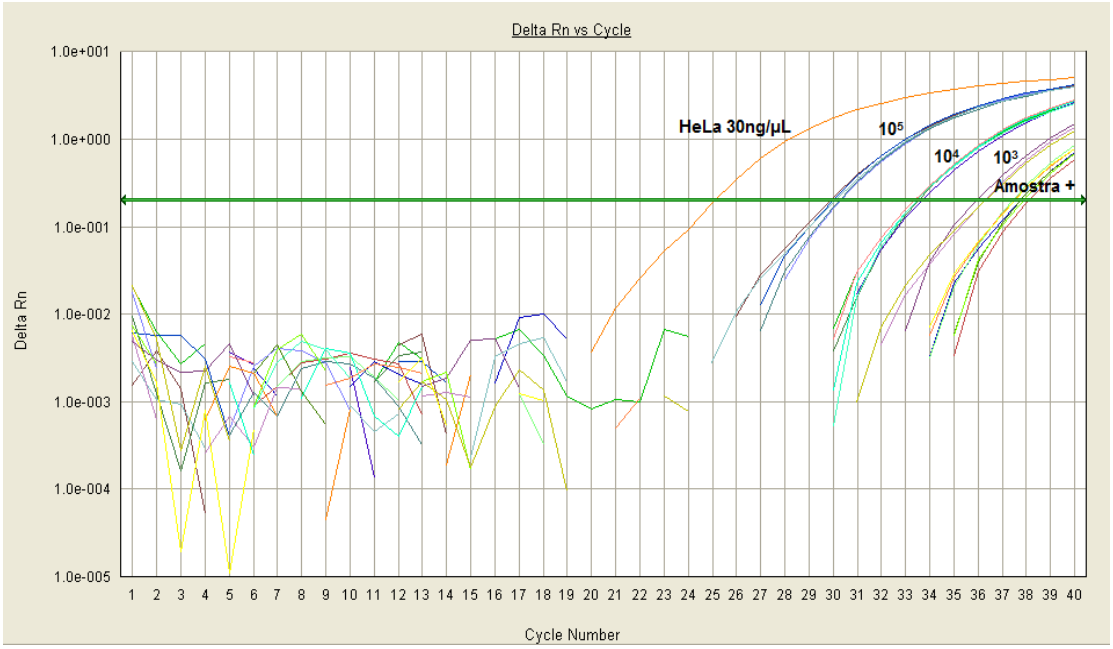


Figura 14 – Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 18 para quantificação (HeLa, pontos da curva e amostra positiva).

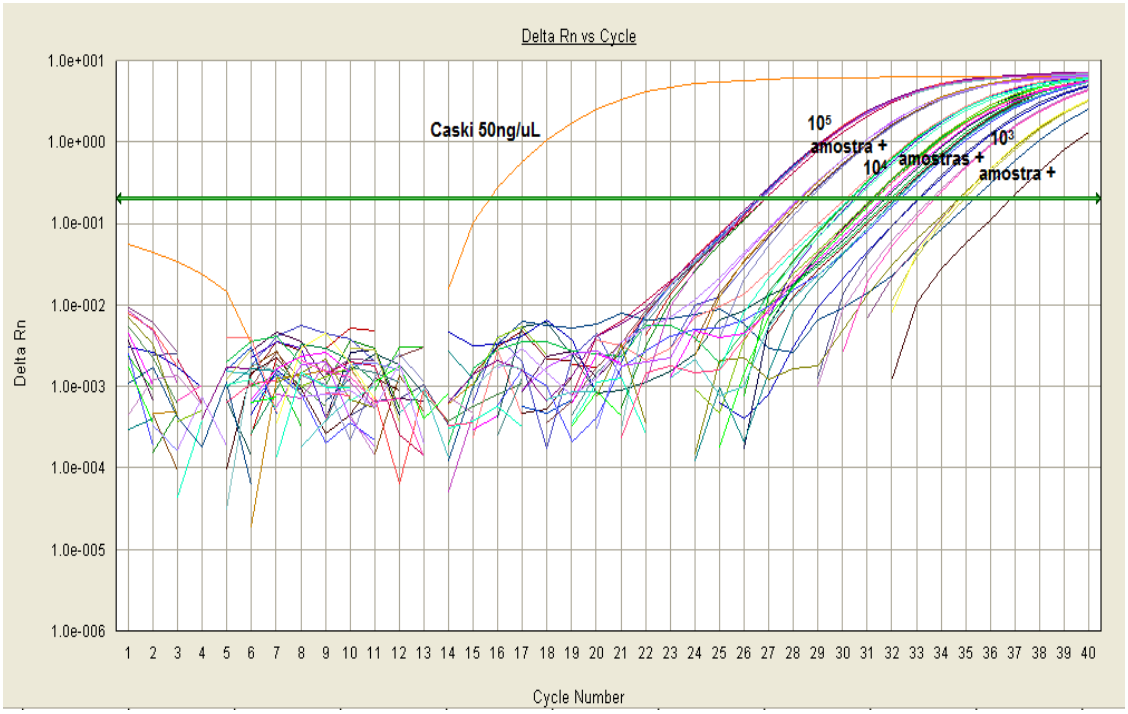


Figura 15 – Análise das curvas de amplificação da reação de PCR em Tempo Real da região E7 de HPV 16 para quantificação (Caski, pontos da curva e amostras positivas).

5.6.1 Análise de DNA HPV no plasma pré-tratamento

Das 131 amostras de plasma pré-tratamento (momento do diagnóstico), 77 (58,8%) foram positivas para DNA de HPV no plasma e 54 (41,2%) foram negativas (Tabela 4). Analisando-se por tipo de HPV temos: 68 plasmas positivos (57,1% - 68/119) e 51 negativos (43,0% - 51/119) para HPV-16, nove plasmas positivos (53,0% - 9/17) e oito negativos (47,0% - 8/17) para HPV-18. Para as cinco pacientes que tiveram tumor positivo para HPV 16 e 18, duas apresentaram plasma negativo para DNA de ambos os tipos (40,0%) e três foram negativas para DNA de HPV-16 mas positivas para DNA de HPV-18 (60,0%) (Tabela 8).

Em relação ao estadio da doença foi observada uma tendência ao aumento da positividade de DNA no plasma com o avanço do estadio do tumor ou gravidade da doença (FIGO): I – 45,2% (14/31), II – 52,5% (32/61), III – 80,0% (20/25) e IV – 76,9% (10/13) (Tabela 8). O teste de Fischer mostrou uma diferença estatisticamente significativa em relação à positividade para DNA de HPV e estadiamento da doença (p=0,0189). Quando comparados entre si, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os estádios I-III (p=0,01276) e II-III (p=0,02774).

Analisando-se a positividade de DNA de HPV no plasma em relação ao tipo histológico encontrou-se associação entre estas duas variáveis (p=0,023), com mais amostras positivas para carcinoma de células escamosas (CEC), 68 positivas em 107 pacientes com CEC (63,6%) e 9 positivas em 24 com ADC (37,5%) (Tabela 8).

Para o tipo de HPV (16 ou 18) e a positividade no plasma não houve associação estatisticamente significativa (p=0,797), com 59,6% para HPV-16, 50% para HPV-18 e 60% para HPV-16 e18 (Tabela 8).

A carga viral de HPV no plasma pré-tratamento variou de 204 cópias/mL a 2.500.000 cópias/mL. Quando comparadas carga viral e as caraterísticas histopatológicas não se encontrou associação estatisticamente significativa em relação ao estadiamento e tipo histológico (p=0,572 e p=0,090), mas em relação ao tipo de HPV, encontrou-se diferenças significativas entre HPV-16 e HPV-18, com maiores cargas virais para HPV-16 (p<0,001).

A média e mediana das cargas virais foram calculadas em cada coleta (pré e pós-tratamento) no total e também separadas por tipo de HPV. A média das cargas virais no pré-tratamento foi de 72.087,2 cópias de HPV/mL e a mediana foi de 3.644,8 cópias de HPV/mL. Os dados estão compilados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Cálculo da média e mediana das cargas virais de HPV no plasma em cada coleta.

	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Coleta 1 (Pré)	72087,2025	3644,8100	297653,51263	204,00	2500000,00
Coleta 2 (Pós)	52169,5100	2804,8000	160968,45055	683,21	537435,20
Coleta 3 (Pós)	45537,2842	8407,0000	125922,36452	629,80	444413,30
Coleta 4 (Pós)	4958,3146	2585,4000	6741,17342	1009,70	25464,00
Coleta 5 (Pós)	5663,5125	3474,5000	5896,02949	930,90	19012,30
Coleta 6 (Pós)	9041,6517	8392,1000	5544,27300	610,80	16071,07
Coleta 7 (Pós)	40890,9000	17129,5000	61676,61105	451,20	147603,30
Coleta 8 (Pós)	44974,0000	44974,0000		44974,00	44974,00
Coleta 9 (Pós)	12651,5300	12651,5300		12651,53	12651,53
Coleta 10 (Pós)	2817,6000	2817,6000		2817,60	2817,60

Tabela 7 – Cálculo da média e mediana das cargas virais por tipo de HPV no plasma em cada coleta.

Tipo de HPV		Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
HPV 16	Coleta 1	81487,3351	4943,3750	315802,75664	391,20	2500000,00
	Coleta 2	56573,3810	2426,6000	168975,69580	683,21	537435,20
	Coleta 3	52869,0600	8407,0000	137897,33548	629,80	444413,30
	Coleta 4	5177,2682	2027,4000	7357,06698	1009,70	25464,00
	Coleta 5	6146,1333	3418,7500	6791,25773	930,90	19012,30
	Coleta 6	9366,4275	10391,9200	7061,50321	610,80	16071,07
	Coleta 7	41445,2750	8863,3000	71203,62999	451,20	147603,30
	Coleta 8	44974,0000	44974,0000		44974,00	44974,00
	Coleta 9	12651,5300	12651,5300		12651,53	12651,53
	Coleta 10	2817,6000	2817,6000		2817,60	2817,60
HPV 18	Coleta 1	1063,9778	324,9000	1046,58971	204,00	2917,90
	Coleta 2	8130,8000	8130,8000		8130,80	8130,80
	Coleta 3	8878,4050	8878,4050	7381,62204	3658,81	14098,00
	Coleta 4	3754,0700	3754,0700	793,04854	3193,30	4314,84
	Coleta 5	4215,6500	4215,6500	2673,21719	2325,40	6105,90
	Coleta 6	8392,1000	8392,1000	1683,62125	7201,60	9582,60
	Coleta 7	38673,4000	38673,4000		38673,40	38673,40
	Coleta 8					
	Coleta 9					
	Coleta 10					

Tabela 8 – Distribuição do DNA de HPV em amostras de plasma de pacientes com câncer cervical dentro das características clínicas e histopatológicas das 137 pacientes estudadas.

Características	Número de pacientes positivos para DNA de HPV (%)		
	Pré-Tratamento		Pós-Tratamento (pelo menos uma amostra positiva)
Estadio*		**Valor de P**	
FIGO I	14 (45,2)		2 (6,7)
FIGO II	32 (52,5)	**P=0,02**	11 (20,4)
FIGO III	20 (80,0)		10 (52,6)
FIGO IV	10 (76,9)		7 (77,8)
Tipo Histológico			
CEC	68 (63,6)	**P=0,02**	26 (28,0)
ADC	9 (37,5)		4 (21,0)
Tipo de HPV no tumor			
HPV 16	68 (59,6)		25 (25,0)
HPV 18	6 (50,0)	**P=0,79**	4 (50,0)
HVP 16 e 18	3 (60,0)		1 (25,0)
Idade			
<50	35 (56,5)		13 (25,5)
50-70	32 (64,0)		12 (25,5)
>50	10 (52,6)		5 (33,3)
Recidiva*	19 (55,9)		19 (59,4)
Persistência	12 (85,7)		3 (100)♣
Sem recidiva ou persistência	46 (54,8)		5 (6,7)♦
Tratamento			
Quimioterapia	59 (61,5)		23 (28,0)
Radioterapia	70 (60,3)	**P>0,05**	27 (26,7)
Cirurgia	16 (47,5)		5 (15,1)
Nenhum	4 (100)		0* (0)

*O estadio era desconhecido em um caso
*O status recidiva era desconhecido em dois casos
* Os quatro casos sem nenhum tratamento não tiveram nenhuma amostra de pós-tratamento, por não terem chegado a iniciar o tratamento.
♣Somente 3 das 14 pacientes com persistência da doença tiveram coleta pós-tratamento, as restantes não tiveram nenhuma coleta pós-tratamento.
♦Somente 75 das 88 pacientes sem recidiva tiveram coleta pós-tratamento.

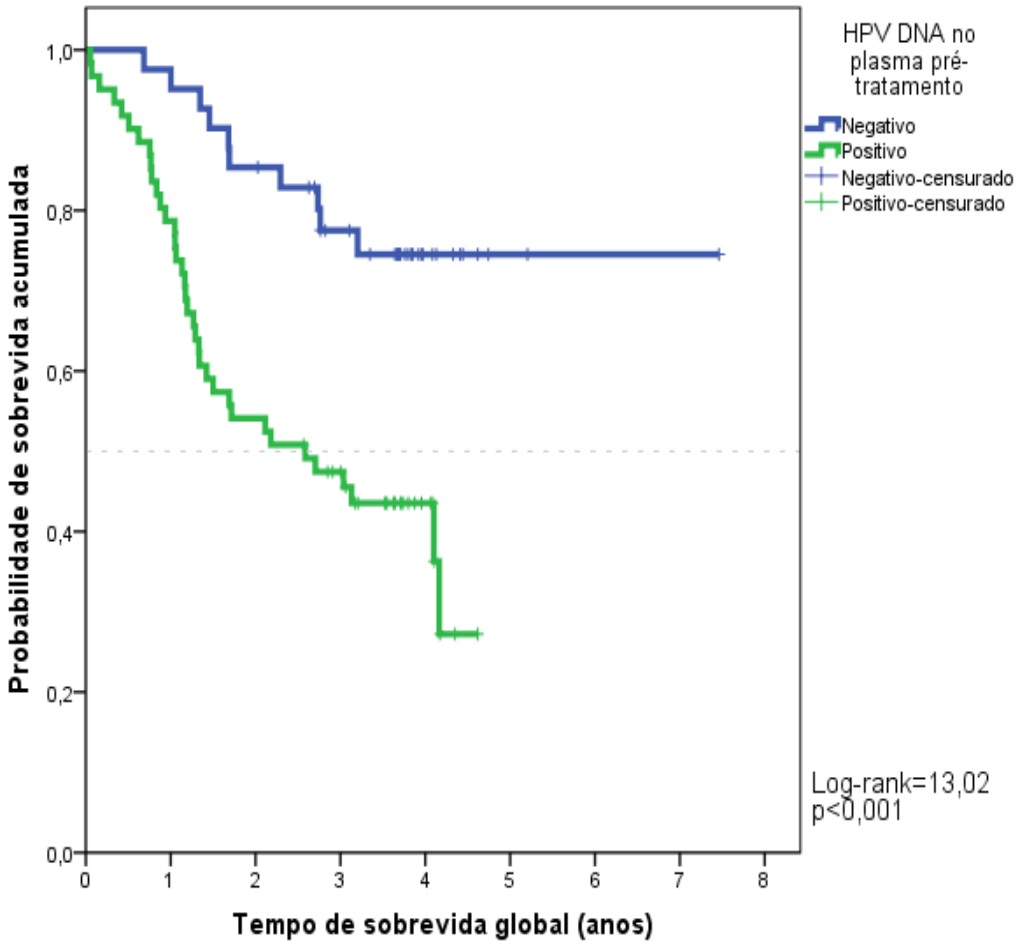
A análise da sobrevida global das pacientes em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento foi possível em 102 amostras, sendo 46 óbitos no total, segundo a Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição do número de pacientes que foram a óbito em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.

DNA HPV no plasma pré-tratamento	N total	N óbitos	Censurados (vivos)	
			N	%
Negativo	41	10	31	75,6%
Positivo	61	36	25	41,0%
Total	102	46	56	54,9%

A análise da sobrevida global em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento mostrou que existem diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida global, segundo a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento ($p<0,001$). O gráfico 1 mostra que as pacientes que foram positivas para DNA de HPV no plasma pré-tratamento tiveram menor tempo de sobrevida global, em anos, em relação às que foram negativas. A curva na cor verde representa as pacientes positivas e na cor azul representa as negativas para DNA de HPV no plasma pré-tratamento. A média do tempo de sobrevida no total foi de 4,5 anos (3,9 – 5,2 anos), sendo de 2,6 anos (2,2 – 3,1 anos) para as positivas e 6,0 anos (5,3 – 6,8) para as negativas. A mediana do tempo de sobrevida no total foi de 4,2 anos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Probabilidade de sobrevida acumulada X tempo de sobrevida global das pacientes em relação a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.



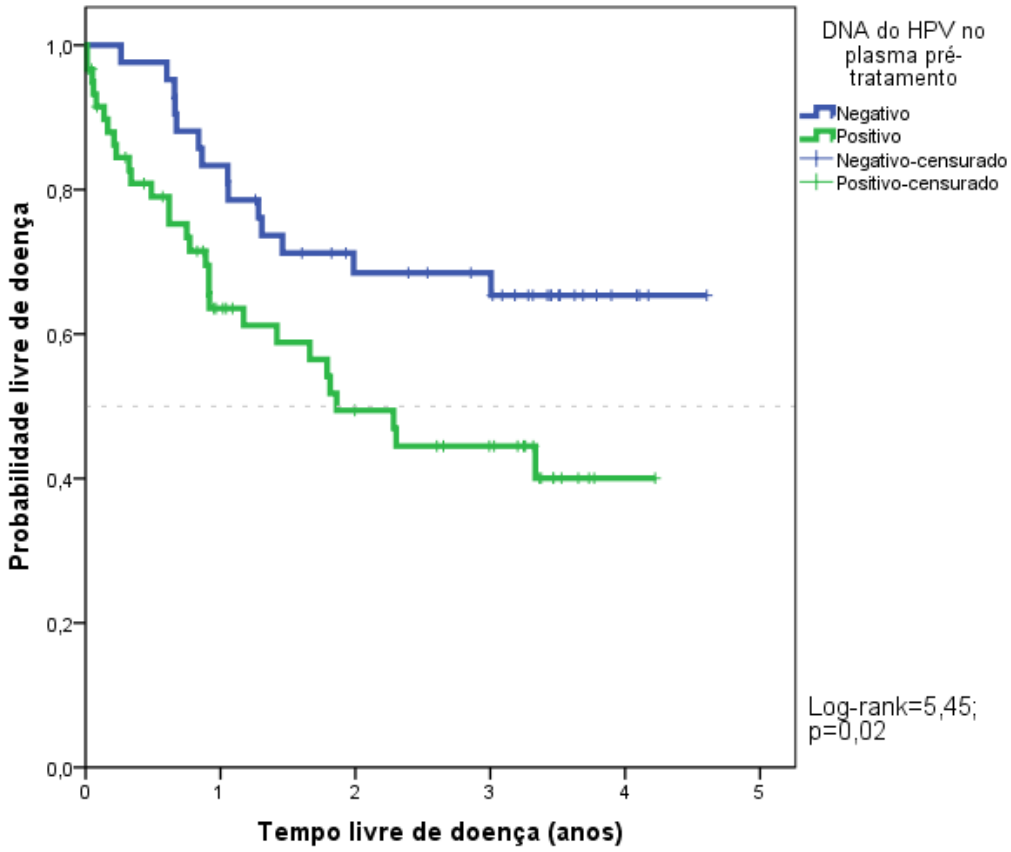
O tempo livre de doença, que corresponde ao período compreendido entre o término do tratamento e o reaparecimento da doença ou a recidiva também foi calculado para 102 pacientes, sendo 43 casos (Tabela 10).

Tabela 10 – Distribuição do número de pacientes que tiveram recidiva ou persistência da doença em relação à presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.

DNA de HPV no plasma pré-tratamento	N Total	N de eventos	Censurados (sem doença)	
			N	%
Negativo	42	14	28	66,7%
Positivo	60	29	31	51,7%
Total	102	43	59	57,8%

Os dados permitem concluir que existem diferenças entre as curvas de sobrevida livre de doença entre as pacientes, segundo a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento (p=0,019). O gráfico 2 mostra que as pacientes que foram positivas para DNA de HPV no plasma pré-tratamento tiveram menor tempo livre de doença, em anos, em relação às que foram negativas. A curva na cor verde representa as pacientes positivas e na cor azul representa as negativas para DNA de HPV no plasma pré-tratamento. A média do tempo livre de doença no total foi de 2,9 anos (2,5 – 3,3 anos), sendo de 2,3 anos (1,9 – 2,8 anos) para as positivas e 3,4 anos (2,9 – 3,9) para as negativas. A mediana do tempo sem a doença foi de 1,9 anos para as positivas (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Probabilidade livre de doença X tempo livre de doença das pacientes em relação a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.



5.6.2 Análise de DNA HPV no plasma pós-tratamento

Das 110 pacientes que seguiram para o estudo de DNA de HPV no plasma de seguimento, considerando-se pelo menos uma amostra coletada, 30 (27,3%) foram positivas para DNA de HPV no plasma em pelo menos uma das coletas de seguimento e 80 (72,7%) foram negativas. Os dados das pacientes positivas para DNA de HPV no plasma pós-tratamento estão especificados nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11 – Quantidade de amostras de pacientes negativas no pós-tratamento.

Pacientes negativas no Pós-tratamento (todas as amostras são negativas) = 80	
Positivas no Pré-Tratamento	32
Negativas no Pré-Tratamento	45

*três pacientes não tiveram coleta de plasma pré-tratamento

Tabela 12 – Quantidade de amostras de pacientes positivas no pós-tratamento.

Pacientes positivas no pós-tratamento (pelo menos uma amostra positiva) = 30	
Positivas no Pré-Tratamento	25
Negativas no Pré-Tratamento	4

*uma paciente não teve coleta de plasma pré-tratamento

Houve uma concordância fraca entre o do DNA de HPV no plasma pré e pós-tratamento (k=0,343). Quatro pacientes não entraram na análise, pois não tiveram coleta de plasma pré-tratamento (Tabela 13).

Tabela 13 – Correlação entre presença de DNA de HPV no plasma pré e pós-tratamento.

			HPV DNA plasma pós-tratamento		Total
			Negativo	Positivo	
HPV DNA plasma pré-tratamento	Negativo	n	45	4	49
		%	42,5%	3,8%	46,2%
	Positivo	n	32	25	57
		%	30,2%	23,6%	53,8%
Total		n	77	29	106
		%	72,6%	27,4%	100,0%

Ao analisarmos as cinco pacientes que foram positivas para ambos os tipos de HPV (16 e 18) no tumor, verificamos que três delas foram positivas apenas para DNA de HPV-18 no plasma pré-tratamento, as outras duas foram negativas para ambos os tipos de HPV. Curiosamente, das coletas de pós-tratamento, a única paciente que tornou-se positiva para DNA de HPV no plasma foi positiva apenas para HPV-18, sendo que a mesma havia sido positiva no plasma pré-tratamento. Três se mantiveram negativas para DNA de HPV de ambos os tipos no plasma de pós-tratamento (duas foram negativas no plasma pré-tratamento e uma foi positiva) e uma, infelizmente, não teve nenhuma coleta de plasma pós-tratamento (sendo positiva no plasma pré-tratamento).

Para verificar se havia algum tipo de relação entre a presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento e a modalidade de tratamento a qual as pacientes foram submetidas, testes qui-quadrado de Pearson foram realizados para cada tipo de modalidade individual, ou seja, somente quem foi tratada com quimioterapia, radioterapia ou cirurgia, e também foram realizados testes para as modalidades individuais ou combinadas (cirurgia, quimioterapia, radioterapia, cirurgia + radioterapia, quimioterapia + radioterapia e cirurgia + quimioterapia + radioterapia. Não se observou associação significativa entre a presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento e as modalidades individuais ou combinadas realizadas ($p=0,622$), radioterapia ($p=0,726$), quimioterapia ($p=0,684$) e cirurgia ($p=0,085$).

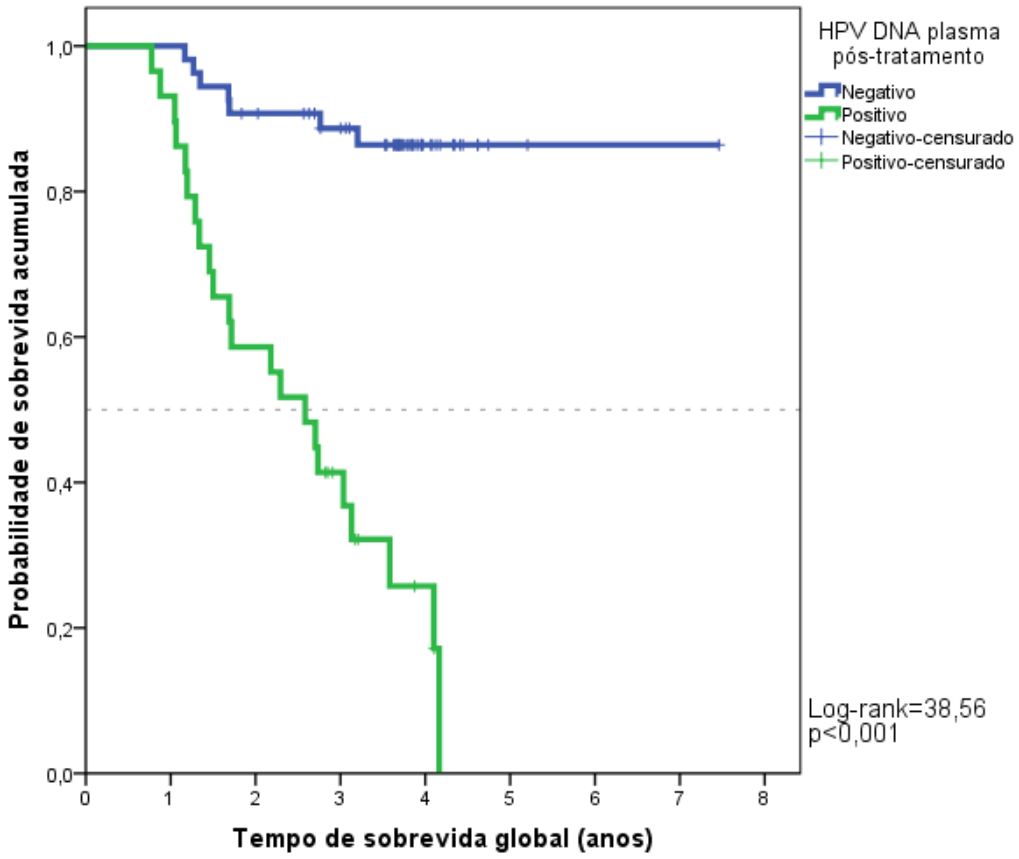
A análise da sobrevida global das pacientes em relação à presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento foi possível em 83 amostras, sendo 29 óbitos no total, segundo a Tabela 14.

Tabela 14 – Distribuição do número de pacientes que foram a óbito em relação à presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento.

HPV DNA plasma pós-tratamento	Total N	Óbitos	Censurado	
			N	%
Negativo	54	7	47	87,0%
Positivo	29	22	7	24,1%
Total	83	29	54	65,1%

O cálculo de sobrevida global das pacientes de pós-tratamento revelou que existe diferença entre as curvas de sobrevida global entre as pacientes segundo a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pós-tratamento ($p<0,001$). O gráfico 3 mostra que as pacientes que foram positivas para DNA de HPV no plasma pós-tratamento tiveram menor tempo de sobrevida global, em anos, em relação às que foram negativas. A curva na cor verde representa as pacientes positivas e na cor azul representa as negativas para DNA de HPV no plasma pós-tratamento. A média do tempo de sobrevida no total foi de 5,2 anos, sendo de 2,5 anos para as positivas e 6,7 anos para as negativas. A mediana do tempo de sobrevida das pacientes positivas para DNA de HPV no plasma pós-tratamento foi de 2,6 anos (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Probabilidade de sobrevida acumulada X tempo de sobrevida global das pacientes em relação a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma após o tratamento.



O número de pacientes que entraram para a análise do tempo livre de doença em relação à presença de DNA de HPV no plasma de pós-tratamento encontra-se detalhado na Tabela 15.

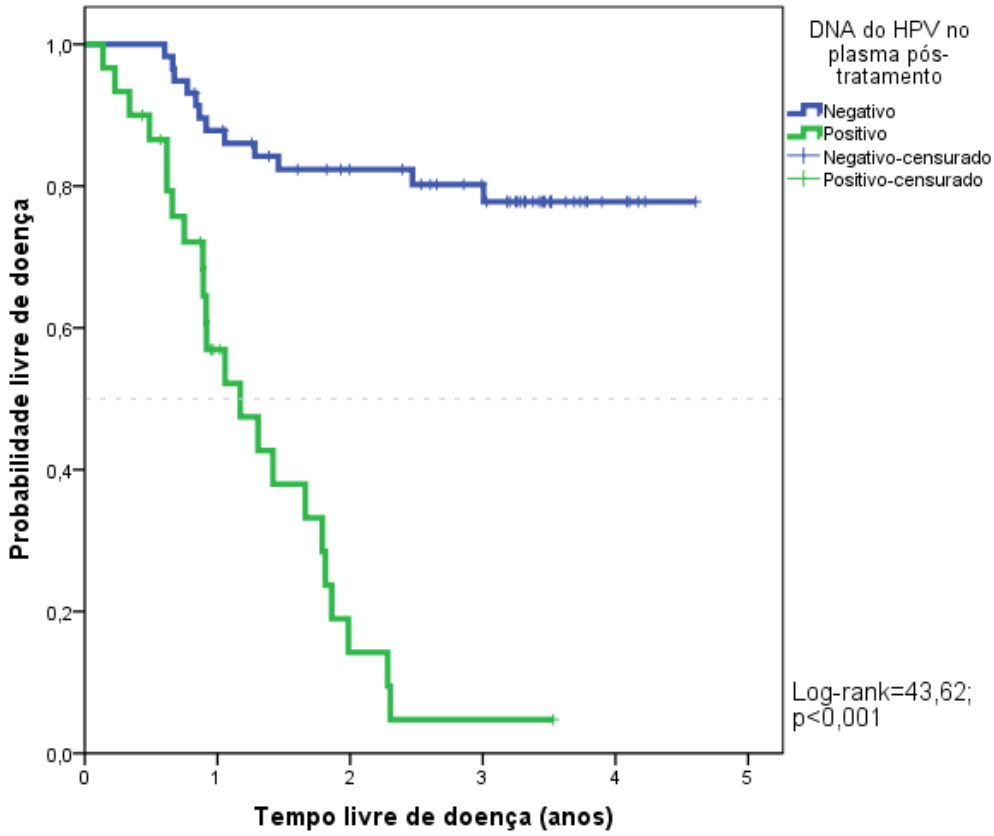
Tabela 15 – Distribuição do número de pacientes que entraram para a análise do tempo livre de doença em relação à presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento.

DNA de HPV no plasma pós-tratamento	N Total	N de eventos	Censurados (sem doença)	
			N	%
Negativo	58	12	46	79,3%
Positivo	30	23	7	23,3%
Total	88	35	53	60,2%

O tempo livre de doença nas amostras de pós-tratamento foi calculado em 88 pacientes, sendo 35 casos de recidiva/persistência da doença.

Observou-se diferença significativa na sobrevida livre de doença entre as pacientes, segundo a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pós-tratamento ($p<0,001$). O gráfico 4 mostra que as pacientes que foram positivas para DNA de HPV no plasma pós-tratamento tiveram menor tempo livre de doença, em anos, em relação às que foram negativas. A média do tempo livre de doença no total foi de 3,1 anos (2,7 – 3,5 anos), sendo de 1,3 anos (1,0 – 1,6 anos) para as positivas e 3,9 anos (3,5 – 4,2) para as negativas. A mediana do tempo sem a doença foi de 1,2 anos para as positivas (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Probabilidade livre de doença X tempo livre de doença das pacientes em relação a presença ou ausência de DNA de HPV no plasma pós-tratamento.



5.6.3 Recidivas e persistência da doença

Numa análise geral das 137 pacientes com câncer cervical analisadas no estudo, 48 (35,3%) reapresentaram a doença (recidiva ou persistência da doença) sendo que 34 tiveram recidiva da doença (25%) e 14 tiveram persistência/progressão da doença (10,3%). Estavam livres da doença até o final da coleta das informações 88 pacientes (64,7%) e uma não se tinha informação sobre o status da paciente.

Como não foi possível ter a coleta de seguimento de todas as pacientes deste estudo, a fim de facilitar a análise de recidiva e persistência, levamos em consideração somente as pacientes que tiveram coleta de pré e pós-tratamento. Sendo assim, de 29 pacientes que apresentaram recidiva ou persistência da doença e ambas as coletas de plasma pré e pós-tratamento, 17 foram positivas para DNA de HPV no momento do diagnóstico (58,6% - 17/29) e 19 foram positivas em pelo menos uma amostra de pós-tratamento (65,5%-19/29). Das 17 pacientes com recidiva/persistência e positivas para DNA de HPV no plasma pré-tratamento, 15 voltaram a ter o DNA de HPV detectável no plasma em pelo menos uma das coletas de seguimento e duas se mantiveram negativas para DNA de HPV no plasma até a última coleta.

Dentre as 48 pacientes com recidiva/persistência analisadas, 31 foram a óbito, 11 continuavam vivas até o fim do seguimento e seis não se tinha o status da paciente em relação à sobrevida.

Das 14 pacientes, dentre as 137 do estudo, que apresentaram persistência da doença, somente três tiveram coletas pós-tratamento e todas as três foram positivas para DNA de HPV tanto no plasma pré-tratamento como no pós-tratamento. Somente uma das pacientes que teve persistência da doença e que foi positiva para DNA de HPV no plasma encontrava-se viva até o final do seguimento do estudo, todas as outras foram a óbito. A maioria das pacientes com persistência da doença foi a óbito dentro de dois meses do término do tratamento, por isso não foi possível a coleta de seguimento.

A única paciente que não tinha informação sobre recidiva (sim ou não) foi negativa para DNA de HPV no plasma pré-tratamento e em todas as coletas de pós-tratamento e encontrava-se viva até o final do seguimento.

Para avaliar a associação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento foram incluídas 130 pacientes,

pois seis delas não se tinha a coleta de pré-tratamento e uma não se tinha informação a respeito do status da paciente em relação da recidiva.

A tabela 16 abaixo contém as informações da correlação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.

Tabela 16 – Correlação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento.

			HPV DNA no plasma pré-tratamento		
			Negativo	Positivo	Total
Recidiva ou persistência da doença	Sem recidiva ou persistência	N	38	46	84
		%	71,7%	59,7%	64,6%
	Recidiva ou persistência	N	15	31	46
		%	28,3%	40,3%	35,4%
Total		N	53	77	130
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Não houve associação estatisticamente significante entre a presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento e a recidiva ou persistência da doença (p=0,161), ou seja, ter o plasma positivo no pré-tratamento não está associado à recidiva da doença.

Para avaliar a associação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento foram incluídas 110 pacientes, pois 26 delas não se tinha a coleta de pós-tratamento e uma não se tinha informação a respeito do status da paciente em relação à recidiva. As informações estão resumidas na Tabela 17.

Tabela 17 – Correlação entre recidiva ou persistência da doença e presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento.

			HPV DNA plasma pós-tratamento		Total
			Negativo	Positivo	
Recidiva ou persistência da doença	Sem recidiva ou persistência	n	68	7	75
		%	85,0%	23,3%	68,2%
	Recidiva ou persistência	n	12	23	35
		%	15,0%	76,7%	31,8%
Total		n	80	30	110
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Os dados amostrais permitem concluir que existe uma associação estatisticamente significante entre a presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento e a recidiva ou persistência da doença ($p<0,001$), ou seja, a presença de DNA de HPV positivo no plasma do pós-tratamento está associado ao aparecimento de recidiva da doença e a ausência do DNA de HPV no plasma após o tratamento está associado à ausência de recidiva.

Das 48 pacientes que reapresentaram a doença, o cálculo do tempo em dias, em que o teste de DNA de HPV no plasma foi positivo antes da data do diagnóstico clínico da doença, foi possível em 16 pacientes com recidiva e duas com persistência da doença, pois 18 pacientes não tinham nenhuma coleta pós-tratamento, uma foi a óbito antes da primeira coleta, sete se mantiveram negativas em todas as amostras de seguimento e quatro tiveram amostras pós-tratamento positivas somente com data posterior à do diagnóstico clínico da doença. O DNA de HPV no plasma foi positivo até 460 dias antes da data do diagnóstico clínico da doença (média de 180 dias, variando de 6 – 460 dias).

O curso da presença do DNA de HPV no plasma de cinco pacientes individuais, sendo de três pacientes que tiveram recidiva, um com persistência ou progressão da doença e um com remissão completa após o tratamento é mostrado nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20.

No caso 79, a paciente foi positiva para DNA de HPV no plasma pré-tratamento (carga viral – cv1 = 2.153,2 cópias de HPV16/mL), estadiamento IB1, tipo histológico CEC, 53 anos. O tratamento terminou 300 dias após o diagnóstico inicial da doença. A primeira coleta pós-tratamento (cv2) foi negativa 85 dias após o término do tratamento. A partir da segunda (cv3), terceira (cv4) e quarta (cv5) coletas a paciente se manteve positiva para DNA de HPV no plasma após 211 dias, 239 dias e 363 dias do término do tratamento, respectivamente (cv3 = 846,8 cópias/mL, cv4 = 1.068,3 cópias/mL e cv5 = 2.213,9). A recidiva clínica foi detectada em 662 dias após o fim do tratamento, portanto o DNA de HPV no plasma foi positivo em 451 dias antes do tempo de diagnóstico clínico da recidiva neste caso. A presença do DNA de HPV no plasma foi detectada um ano e três meses antes do aparecimento clínico da doença (Figura 16).

No caso 98, a paciente foi positiva para DNA de HPV no plasma pré-tratamento (carga viral – cv1 = 1.296,8 cópias de HPV 18/mL), estadiamento IIB, tipo histológico ADC, 33 anos. O tratamento terminou 102 dias após o diagnóstico inicial. A primeira coleta pós-tratamento (cv2) foi negativa 45 dias após o término do tratamento e a segunda coleta (cv3) também foi negativa após 108 dias do final do tratamento. A partir da terceira coleta a paciente tornou-se positiva para DNA de HPV no plasma após 220 dias do término do tratamento (cv4 = 4.314,8 cópias/mL). A recidiva clínica foi detectada em 226 dias após o fim do tratamento, portanto o DNA de HPV no plasma foi positivo em 6 dias antes do tempo de diagnóstico clínico da recidiva, neste caso. A presença do HPV no plasma foi detectada muito próxima

ao tempo da detecção clínica da doença e o óbito se deu após 548 dias do diagnóstico inicial da doença (Figura 17).

No caso 128, a paciente foi positiva para HPV-16 e 18 no tumor e positiva apenas para DNA de HPV-18 no plasma pré-tratamento (carga viral – cv1 = 204,0 cópias de HPV 18/mL), estadiamento IIB, tipo histológico CEC, 69 anos. O tratamento terminou 128 dias após o diagnóstico inicial. A primeira coleta pós-tratamento (cv2) foi negativa para ambos os tipos, 52 dias após o término do tratamento e a segunda coleta (cv3) também foi negativa para ambos os tipos, após 139 dias do final do tratamento. A partir da terceira (cv4), quarta (cv5) e quinta (cv6) coletas a paciente tornou-se positiva apenas para DNA de HPV-18 no plasma após 265 dias, 361 dias e 454 dias do término do tratamento, respectivamente (cv4 = 3.193,3 cópias/mL, cv5 = 6.105,9 cópias/mL, cv6 = 7.201,6 cópias/mL). A recidiva clínica foi detectada em 518 dias após o fim do tratamento, portanto o DNA de HPV no plasma foi positivo em 253 dias antes do tempo de diagnóstico clínico da recidiva neste caso. A presença do HPV no plasma foi detectada em oito meses e meio antes do tempo da detecção clínica da doença (Figura 18).

No caso 135, a paciente foi positiva para DNA de HPV no plasma pré-tratamento (carga viral – cv1 = 45.269,9 cópias de HPV 16/mL), estadiamento IVA, tipo histológico CEC, 66 anos. O tratamento terminou 314 dias após o diagnóstico inicial. A primeira coleta pós-tratamento foi positiva 24 dias após o término do tratamento (cv2 = 537.435,2). A persistência e progressão clínica foram detectadas em 26 dias após o fim do tratamento. A presença do HPV no plasma confirmou a persistência clínica da doença. A paciente foi a óbito em 74 dias após o final do tratamento, ou seja, a sobrevida correspondeu a um ano após o diagnóstico do tumor em estadio avançado (Figura 19).

No caso 83, a paciente foi positiva para DNA de HPV no plasma pré-tratamento (carga viral – cv1 = 31090,6 cópias de HPV 16/mL), estadiamento IIB,

tipo histológico CEC, 36 anos. O tratamento terminou 114 dias após o diagnóstico inicial. Todas as cinco coletas pós-tratamento (cv2, cv3, cv4, cv5 e cv6) foram negativas após 54 dias, 139 dias, 265 dias, 383 dias e 495 dias do término do tratamento, respectivamente. Esta paciente apresentou remissão completa da doença após o tratamento primário (Figura 20).

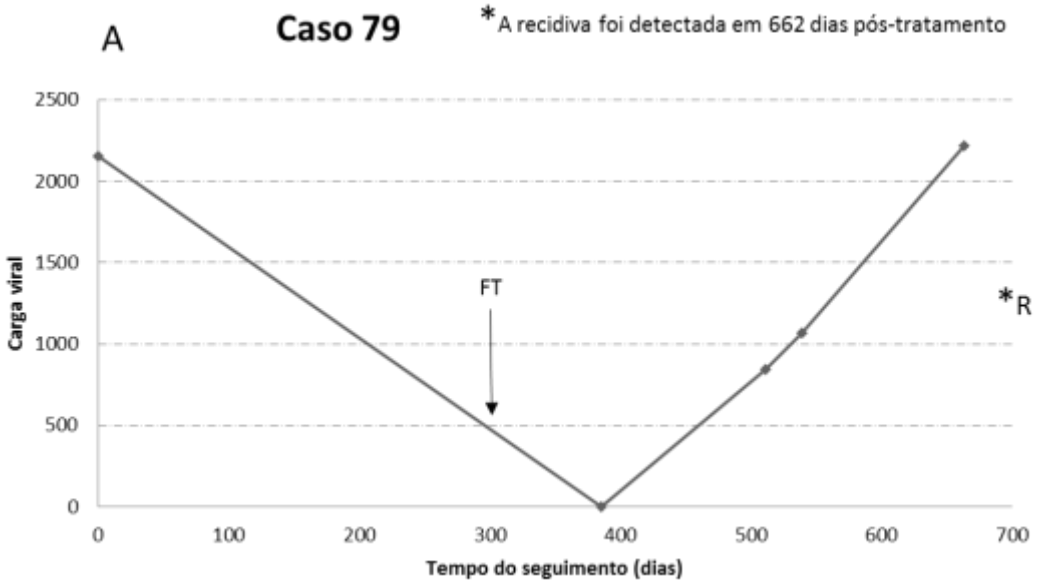


Figura 16 – Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 79). FT, final do tratamento; R, recidiva.

***A recidiva representada na figura 8 está apenas de forma ilustrativa, pois o tempo de seguimento termina em 700 dias, a posição correta é em 962 dias de seguimento.**

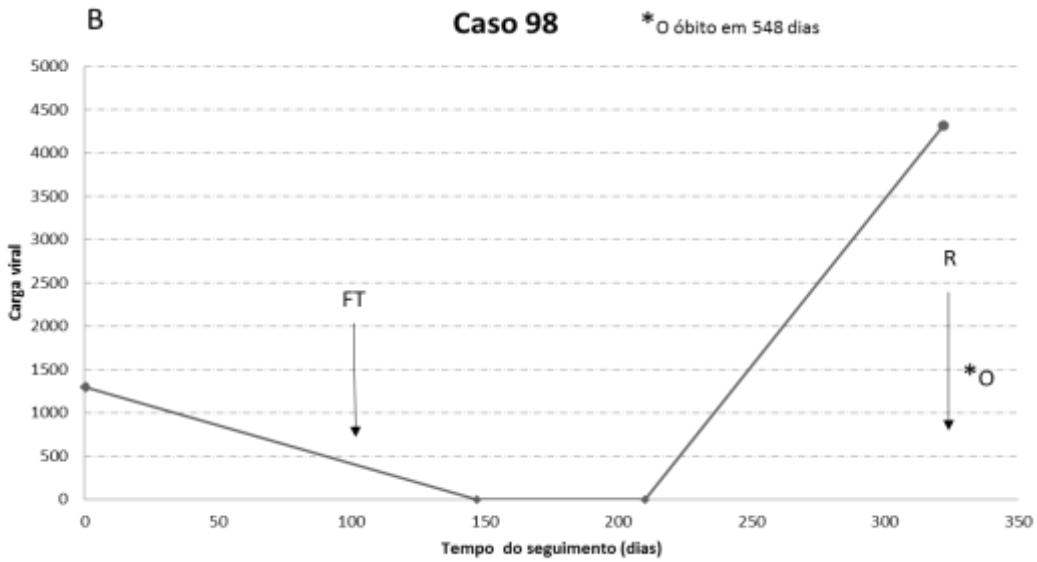


Figura 17 – Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 98). FT, final do tratamento; R, recidiva; O, óbito.

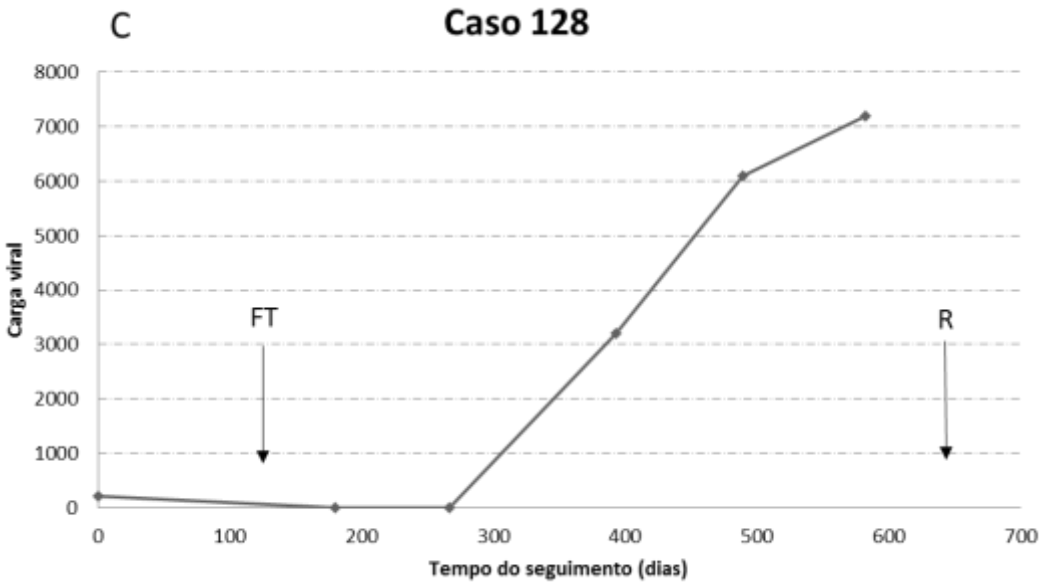


Figura 18 – Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou recidiva do tumor (Caso 128). FT, final do tratamento; R, recidiva.

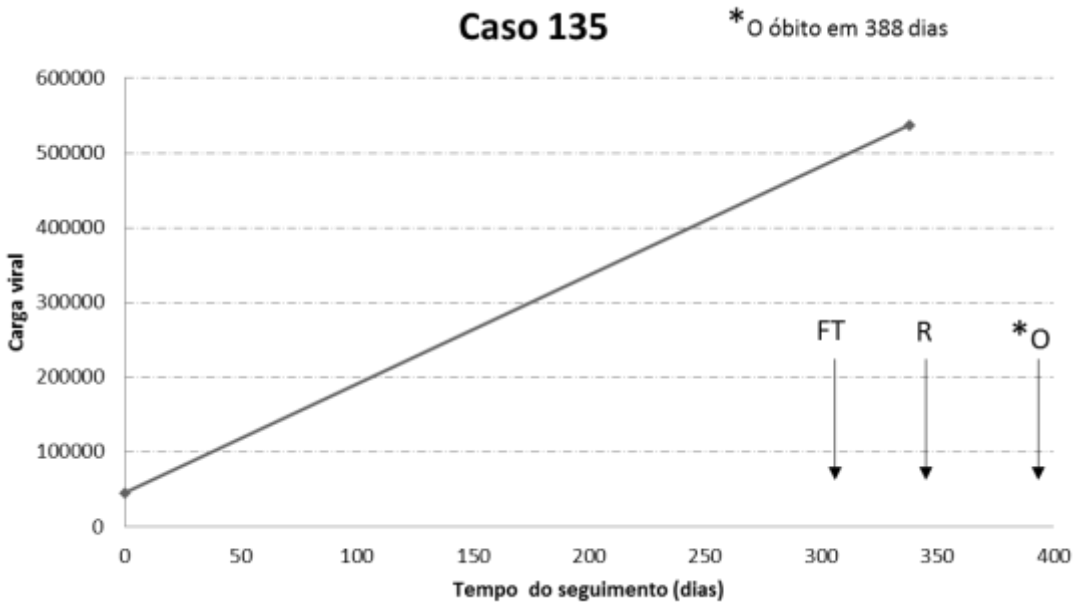


Figura 19 – Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou persistência da doença durante tratamento primário (Caso 135). FT, final do tratamento; R, recidiva; O, óbito.

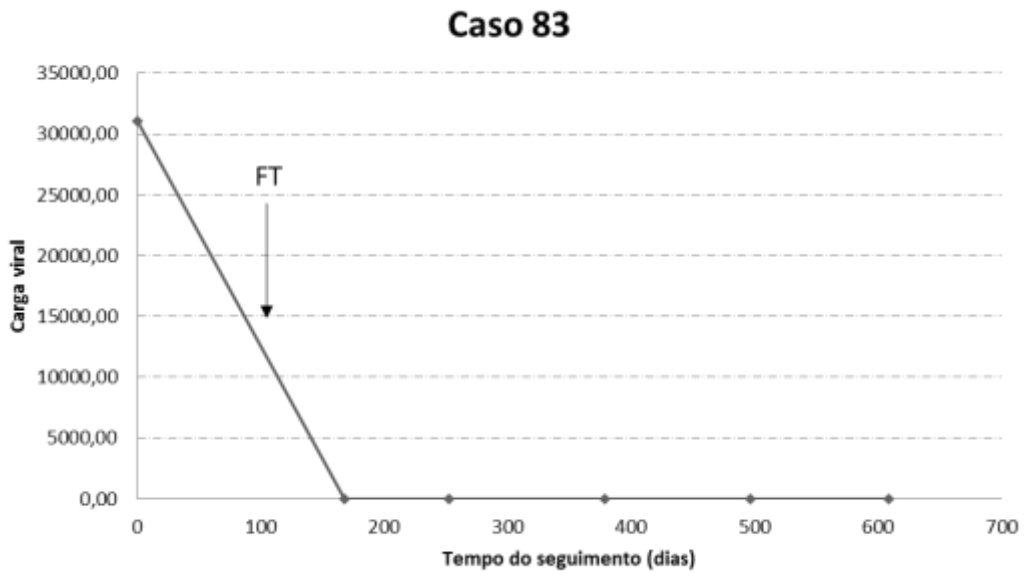


Figura 20 – Seguimento longitudinal do DNA de HPV no plasma de paciente com câncer cervical que apresentou remissão completa da doença após o tratamento primário (Caso 83). FT, final do tratamento.

6 DISCUSSÃO

O câncer cervical permanece entre os principais cânceres responsáveis pela morte de mulheres no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Apesar de ser um tipo de câncer que, quando detectado precocemente, é passível de tratamento e cura de acordo com o estadio clínico, algumas mulheres apresentam o reaparecimento da doença ou falha no tratamento, os quais nem sempre são detectados precocemente, diminuindo as chances de cura e a sobrevida da paciente.

Marcadores tumorais, especialmente quando sensíveis e específicos, são de grande valor no manejo de pacientes com câncer. Vários trabalhos têm demonstrado evidências da ocorrência de DNA viral, como um DNA originado do tumor, na circulação de pacientes com tumores primários causados por infecção viral, como no caso do carcinoma de nasofaringe, causado pelo EBV, câncer cervical e carcinoma de orofaringe, ambos associados à infecção por HPV e carcinoma hepatocelular, causado pelo HBV[11, 12, 66, 88, 90, 91, 96-105, 108, 110, 124].

No caso de pacientes com carcinoma de nasofaringe, a detecção do DNA de EBV no soro tem demonstrado ser um excelente marcador tumoral no seguimento destes pacientes com significante elevação da carga viral no soro, com detecção de até 6 meses antes da manifestação clínica em pacientes que subsequentemente desenvolvem recidiva do tumor[92, 124].

Baseado nestas evidências, o presente estudo teve por objetivo verificar a presença de DNA de HPV no plasma de mulheres no momento do diagnóstico de câncer cervical e após o término do tratamento, através de um teste de PCR em Tempo Real tipo específico para os tipos de HPV mais prevalentes em tumores, os

HPVs-16 e 18, e concluiu-se que o teste de DNA plasmático padronizado apresentou importante capacidadepara ser utilizado como um marcador tumoral precoce de recidiva de câncer cervical.

Neste estudo, o DNA de HPV em amostras de plasma obtidas no momento do diagnóstico (pré-tratamento) foi detectado em 77 de 131 (58,8%) pacientes com câncer cervical, investigadas usando o teste de PCR Real Time HPV tipo-especifico padronizado. A presença de DNA de HPV no plasma por tipo de HPV foi de 57,1% para HPV-16 e 52,9% para HPV-18.

Gnanamony e colaboradores[88] também analisaram a presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento por tipo de HPV e encontraram taxa de detecção parecida para HPV-16 (56,4%), porém, menor para HPV-18 (20%) e com isso questionaram se este era um fenômeno biológico ou se era devido ao baixo número de mulheres com HPV-18 no tumor (n=20), comparadas com as que tinham HPV-16 (n=94) recrutadas para o estudo.

Liu e colaboradores[96] encontraram 17,5% de amostras positivas para DNA de HPV-16 e 2,5% de amostras positivas para HPV-18 no plasma. Arias e cols(105) encontraram 57,7% de amostras positivas para DNA de HPV-16 e 100% de amostras positivas para HPV-18 no plasma. Jaberipour et al.[101] encontraram 5% de amostras positivas para DNA de HPV-16 e 18,5% de amostras positivas para HPV-18 no plasma e, para justificar esta diferença levaram em consideração o fato de o HPV-18 ser o tipo mais frequente nos pacientes do sul do Irã.

O que podemos observar com os nossos resultados é que, mesmo com um número menor de amostras de pacientes positivas para HPV-18 no tumor (n=17) em relação às positivas para HPV-16 (n=119), a detecção de DNA de HPV-18 no plasma pré-tratamento foi semelhante à positividade para HPV-16, mostrando que

outros fatores, além de um fenômeno biológico e número amostral, podem estar envolvidos, assim como fatores pré e pós-analíticos.

Curiosamente, ao analisarmos as cinco pacientes que foram positivas para HPV-16 e 18 no tumor deste estudo, verificamos que todas as três que tiveram a presença de DNA de HPV no plasma pré-tratamento foram positivas apenas para HPV-18. Das três, apenas uma voltou a ser positiva no plasma pós-tratamento, sendo que o único tipo presente foi o HPV-18. Uma das pacientes não teve nenhuma coleta de pós-tratamento e a outra se manteve negativa para ambos os tipos em todas as coletas de seguimento. Nossa observação foi consistente com os achados de Arias e colaboradores[105], que ao analisar quatro amostras positivas para ambos os tipos em esfregaços cervicais, as duas únicas que foram positivas para DNA de HPV no plasma, no momento do diagnóstico de câncer cervical, foram positivas apenas para HPV-18. Com isso, Arias e colaboradores[105] sugerem que possa haver diferentes taxas de liberação do DNA viral no plasma entre os tipos. Outra hipótese seria a de que a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro seja a condição promotora para a detecção de DNA viral liberado junto com o DNA genômico do hospedeiro no plasma. Outra questão que poderia ser melhor investigada é se tumores positivos para HPV-18 acometem regiões mais vascularizadas do útero, facilitando assim, o acesso à corrente sanguínea, como os tumores do canal endocervical. Porém, estas hipóteses devem ser melhor estudadas, com um maior número de casos, levando-se em consideração fatores do hospedeiro e do próprio vírus que possam gerar essa diferença nas taxas de detecção.

A detecção de DNA de HPV, tanto no plasma como no soro de pacientes com câncer, tem sido descrita recentemente. As taxas de detecção variam de 7 a 70% [11, 12, 66, 88, 96-106, 108-110]. Estes estudos anteriores usaram diferentes populações,

materiais (soro ou plasma), diferentes métodos de extração do DNA, diferentes iniciadores ou sondas e diferentes técnicas de amplificação, desta forma, comparações das taxas de detecção do DNA de HPV, seja no soro ou plasma, ficam um pouco limitadas.

Widschwendter[12] justifica sua escolha pelo uso de soro como material de estudo baseando-se na comparação das taxas de detecção de DNA de HPV no soro de pacientes com câncer cervical apenas com o trabalho de Liu e colaboradores[96], o qual apresentou taxa de detecção de 20% e com outros dois trabalhos que utilizaram o plasma como material de estudo e que apresentaram taxas de 7% e 12%, sendo os trabalhos de Dong et al.[97] e Pornthanakasem et al.[11]. Porém, quando avaliamos todos os estudos disponíveis na literatura, verificamos que taxas de detecção maiores que 50% são aquelas de trabalhos que analisaram o plasma (variando de 51,9 a 70%)[12, 66, 88, 100, 103, 105]. El Messaoudi e colaboradores[114] abordaram esta questão sobre qual o melhor material de escolha e concluíram que o plasma é uma matriz melhor que o soro.

Questões sobre dificuldades de comparação entre os trabalhos que utilizam o cf-DNA por ausência de uma padronização vêm sendo estudadas e apontam que não só o tipo de matriz de escolha é importante, mas todo o processo pré e pós-analítico também devem ser levados em consideração. El Messaoudi e colaboradores[114] listaram uma série de pontos importantes na fase pré-analítica de testes que utilizam cf-DNA[12, 66, 100, 103, 105].

No nosso estudo escolhemos o plasma para buscar a presença de DNA de HPV, seguimos a maioria das recomendações sobre processamento, armazenamento e manipulação das amostras e encontramos uma positividade para DNA de HPV no plasma, no momento do diagnóstico da doença, próxima a dos

trabalhos com as maiores taxas de detecção. A taxa de positividade do nosso estudo (58,8%) ficou próxima dos achados de Yang (56%), Gnanamony (51,9%), Arias (54,1%) e Wei e colaboradores (64,7%), nos quais todos utilizaram plasma como material de estudo[66, 88, 103, 105].

Vários trabalhos dão indícios de que o DNA de HPV no plasma é um marcador genético específico para tumores associados ao HPV, uma vez que ele não é detectado em controles normais ou outros tumores não associados à infecção por HPV[11, 12, 66, 88, 98, 100, 103, 105, 106]. Todas as amostras de controle saudáveis (plasma de gestantes) testadas no nosso estudo foram negativas para a presença de DNA de HPV-16 e 18.

No presente estudo foi encontrada uma correlação entre a positividade de DNA de HPV no plasma pré-tratamento e o avanço do estadio clínico da doença (p=0,0189), com as maiores taxas de positividade nos estadios mais avançados (III-80% e IV-76,9%), estando de acordo com os achados na literatura[88, 90, 98, 101, 105].

Gnanamony e colaboradores[88] encontraram também uma boa correlação entre estadiamento e presença de DNA de HPV no plasma de mulheres com câncer cervical (p<0,001) e sugerem que isto deve acontecer porque, com o progresso da neoplasia, deve haver maior liberação do vírus na circulação. Um estudo que avaliou a presença de DNA de HPV no soro de pacientes com carcinoma de orofaringe também encontrou associação com o estadio da doença[90]. Contraditoriamente, apesar de verificar uma tendência ao aumento de detecção do DNA de HPV no plasma ou soro, alguns trabalhos não encontram correlação entre o estadio da doença e a presença de DNA de HPV[12, 66, 96, 97, 99, 100, 102].

Em relação ao tipo histológico, no nosso estudo houve correlação

significante sendo o DNA de HPV-16 mais frequentemente detectado no plasma pré-tratamento de pacientes diagnosticadas com CEC (63,6%) do que nas pacientes diagnosticadas com ADC (p=0,02301). Dong et al.[97] e Yang et al.[66] também encontraram mais pacientes positivas para DNA de HPV no plasma diagnosticadas com CEC do que as com ADC, porém essa relação não foi estatisticamente significante. Não se sabe se há uma explicação biológica, mas talvez essa diferença encontrada seja devido à diferença no número de amostras de cada tipo histológico ou ao acesso a maior ou menor vascularização que diferentes regiões do útero possam ter, por isso os achados devem ser interpretados com cautela. Se esta relação for futuramente confirmada, este achado pode apontar possíveis diferenças entre essas duas formas de CC histologicamente distintas.

Quando comparamos as cargas virais das amostras de plasma pré-tratamento com as características histopatológicas das pacientes, não encontramos correlação entre carga viral e estadiamento da doença, assim como para o tipo histológico. Yang et al.[66] e Gnanamony et al.[88] analisaram a relação entre carga viral com estadiamento e com tipo histológico (CEC ou ADC) para os tipos de HPV-16 e 18 e também não encontraram correlação entre o número de cópias de DNA de HPV-16 e 18 no plasma de pacientes com câncer cervical com o estadiamento FIGO e/ou tipo histológico[66, 88]. Em contrapartida, outros estudos mostraram uma correlação entre o aumento da carga viral e o avanço do estadiamento clínico da doença[97, 104]. Além do estadio da doença e do tipo histológico, fatores do hospedeiro talvez possam contribuir para maiores ou menores níveis de cargas virais de DNA de HPV detectadas no plasma de mulheres com câncer cervical (por exemplo, capacidade de depuração do DNA liberado na corrente sanguínea).

Comparando-se as cargas virais das amostras positivas para HPV-16 com

as positivas para HPV-18 no plasma de pré-tratamento, verificamos uma diferença estatisticamente significante, com maiores cargas virais nas amostras positivas para HPV-16. Isto pode ter ocorrido pelo fato de o número de amostras de HPV-16 do estudo ser maior do que as de HPV-18. Não encontramos dados na literatura que comparassem as cargas virais no plasma entre os tipos de HPV, apenas os dados de Ho e colaboradores[102] que analisaram as cargas virais de DNA de HPV no sangue de pacientes com câncer cervical antes e depois do tratamento e verificaram cargas virais maiores para ambos HPV 16 e 52 (média de 586 cópias/mL e 771 cópias/mL, respectivamente) do que para HPV 18 (média de 1,8 cópias/mL).

As informações de evolução clínica do momento do diagnóstico até o final do seguimento ou óbito da paciente, associados aos achados relacionados à presença ou ausência de DNA de HPV no plasma, mesmo que incompletos, nos permitiram avaliar o valor do teste de DNA de HPV no plasma como marcador de recidiva e sua relação com recaída da doença, sobrevida global e tempo livre de doença das pacientes deste estudo.

Uma revisão sistemática feita por Elit e colaboradores a respeito de programas de seguimento de mulheres após tratamento de câncer cervical mostrou que as recidivas variam de 7 a 26 meses, as taxas de detecção variam de 8 a 26%, que destas 8-26% pacientes com recidiva, 89-99% recidivaram no quinto ano após tratamento primário e que a média de sobrevida após recidiva variou de 7-17 meses[7].

Bodurka-Bevers e colaboradores[60] verificaram que 13% das pacientes de seguimento após tratamento de câncer cervical desenvolveram recidiva, o tempo livre de doença foi de 17 meses e que a mediana de sobrevida do diagnóstico inicial

foi de 31 meses para as pacientes sintomáticas e 83 meses para as assintomáticas.

Os dados da literatura a respeito das taxas de recidiva, tempo livre de doença, sobrevida geral e tempo de seguimento ideal após o tratamento primário de câncer cervical variam muito e essas diferenças se dão não só pelas diferenças entre as populações estudadas, mas também devido à diferença do número de testes utilizados e à variedade de intervalos dos programas de seguimento[7].

A análise da presença de DNA de HPV no plasma de seguimento do nosso estudo foi possível em 110 pacientes, sendo 30 delas (27,3%) positivas em pelo menos uma das coletas de pós-tratamento, independente do status da paciente em relação à presença de DNA de HPV no plasma de pré-tratamento. Das 30 pacientes que foram DNA de HPV positivas no seguimento, 23 apresentaram recidiva ou persistência da doença (76,7%). Dessas 23 pacientes com reaparecimento da doença, a detecção do DNA de HPV foi possível de 6 a 460 dias antes da detecção clínica da doença.

Essa alta taxa de pacientes com recidiva e presença de DNA de HPV no plasma pós-tratamento (76,7%) observadas neste estudo vai de encontro com observações de Widschwendter et al.[12]. Durante o seguimento das pacientes que foram tratadas para câncer cervical, verificaram que o DNA de HPV foi positivo no soro em 78% (14 de 18) dos pacientes com recidiva ou persistência da doença e que a presença de DNA de HPV foi positiva em até 423 dias antes do diagnóstico clínico de recidiva, indicando que o DNA de HPV no soro pode ser um marcador adicional para detecção precoce de recidiva em pacientes com câncer cervical após o tratamento[12].

Em relação às recidivas, o teste log-rank (Kaplan-Meier) mostrou que existe uma associação estatisticamente significante entre a presença de DNA de HPV no

plasma pós-tratamento (p<0,001) e a recidiva ou persistência da doença, mas não em relação à presença do DNA de HPV no pré-tratamento (p=0,161).

Singh e colaboradores[99], usando também a estimativa Kaplan-Meier, verificaram que a alta prevalência de DNA de HPV no plasma de pacientes com câncer cervical pós-radioterapia mostrou significante associação com recidiva da doença e sugerem o seu uso na detecção precoce de pacientes que possuem risco aumentado para recidiva ou progressão da doença.

A avaliação da sobrevida livre de doença e da sobrevida global das pacientes que foram positivas para DNA de HPV no plasma pré e pós-tratamento mostrou um menor tempo livre de doença e menor sobrevida global para as positivas, em anos, em relação às que foram negativas, ou seja, o prognóstico das pacientes que apresentam DNA de HPV no plasma detectável é pior. Segundo Duyn et al.[64], o intervalo de tempo livre de doença é um dos fatores prognósticos significantes para a sobrevida no caso de recorrência da doença.

A média do tempo livre de doença, que corresponde ao tempo compreendido entre o final do tratamento e o reaparecimento da doença, do presente estudo foi de 3,1 anos (2,7 – 3,5 anos), semelhante ao verificado no estudo de Sartori et al.[63] onde a maioria das recidivas de câncer endometrial e cervical ocorreram dentro dos 3 primeiros anos após o tratamento primário. Pornthanakasem et al.[11] reportaram que pacientes com DNA de HPV no plasma tiveram tendência a desenvolver recidiva ou metástases distantes dentro de um ano após a finalização do tratamento.

A associação entre DNA de HPV no plasma e metástases não foi avaliada neste estudo. Pornthanakasem et al.[11], Mutirangura et al.[107], Capone et al. [108] e Ho et al.[102] sugerem forte associação entre ambos, considerando o DNA de HPV

no plasma como indicador de metástases distantes e estadios mais avançados.

Como já citado neste trabalho, a forma como o cf-DNA é liberado na corrente sanguínea ainda não está bem definida mas a maioria dos autores acredita que ele se origina da morte de células tumorais[8, 73, 81, 82]. Alguns trabalhos sobre cânceres associados à infecção pelo HPV buscaram demonstrar essa relação, confirmando que o tipo de HPV encontrado no tumor primário era o mesmo tipo encontrado no plasma ou soro[11, 12, 66, 88, 97-99, 102, 103, 105, 106, 110]. Cao et al.[110] realizaram um estudo xenográfico onde implantaram cultura de células positivas para HPV (SSC90 –HPV-16 e HeLa – HPV-18) em camundongos e posteriormente coletaram sangue para analisar o plasma. Todos os camundongos que receberam a implantação de cultura de células contendo HPV foram positivos para DNA de HPV no plasma, enquanto todos os camundongos-controle foram negativos, indicando que o DNA de HPV circulante foi derivado diretamente dos tumores implantados que abrigavam DNA de HPV. Outros estudos sequenciaram amostras de soro que foram positivas para DNA de HPV e compararam com as sequencias de DNA de HPV obtidas do tumor da mesma paciente, obtendo resultados idênticos, indicando a origem do DNA de HPV presente no soro[66, 98, 88]. Pornthanakasem et al.[11] demonstraram que o status físico do DNA de HPV no plasma era idêntico ao do tumor por encontrar-se integrado ao genoma do hospedeiro, característica essa necessária para o desenvolvimento do câncer cervical.

Nossos resultados indicam que a detecção de DNA de HPV circulante em pacientes com câncer, após o tratamento, pôde predizer uma tendência ao desenvolvimento de recidiva da doença e pode vir a ser um marcador sensível e específico de doença residual. Vários trabalhos também mostraram evidências disso[11, 12, 66, 99, 100, 102].

Duenas[100] observou um clareamento do DNA de HPV nas pacientes que obtiveram resposta completa ao tratamento do câncer cervical, mas não nas que apresentaram persistência da doença, além disso, as que atingiram resposta completa ao tratamento mas apresentaram recaída da doença após tratamento se tornaram positivas para HPV no plasma novamente[100].

Ho et al.[102] fizeram a análise da presença de DNA de HPV dos tipos 16, 18 e 52 no sangue total após o tratamento para câncer cervical e concluíram que a detecção de DNA de HPV circulante após tratamento pode predizer recidiva. Durante o seguimento, verificaram que 8 de 10 pacientes positivas para DNA de HPV no sangue pré-tratamento tiveram recidiva ou falha no tratamento (87,5%), três meses após o tratamento. Dentre as 8 pacientes, 7 tiveram metástases distantes. Os outros 2 que não tiveram recidiva, um foi negativo para DNA de HPV após 9 meses do tratamento e estava clinicamente livre de doença, enquanto o outro permaneceu positivo para DNA de HPV no sangue e estava clinicamente livre de doença até a última coleta de seguimento. Os outros 6 pacientes que foram negativos para DNA de HPV no sangue após o tratamento não apresentaram recidiva até o final do seguimento. Vale ressaltar que Ho et al.[102] usaram sangue total como matriz para a identificação de DNA de HPV na circulação de pacientes com câncer cervical e isso pode explicar o motivo de terem altas taxas de detecção de DNA de HPV no sangue de pós-tratamento das pacientes que tiveram recidiva (87,5%) e metástases por conter mais componentes que possam carregar o DNA de HPV, como células metastáticas.

Verificamos neste estudo que de sete pacientes que não tiveram recidiva, mas que apresentaram o reaparecimento do DNA de HPV no plasma após o tratamento em alguma das coletas, três positivaram em dois a três meses após o término do tratamento e depois negativaram, e quatro se mantiveram positivas em

todas as coletas de pós tratamento. Uma possível explicação para o fato de ser positivo em até 3 meses após o tratamento e depois negativar é a de que essa detecção transiente estaria pegando resquícios de DNA liberado por morte de células tumorais e que depois se torna negativo, indicando que o tratamento se completou. Já das que se mantiveram positivas em todas as coletas, ou pode ter havido uma falha dos testes de seguimento da paciente não detectando uma persistência da doença até o momento do final do seguimento do nosso estudo, ou um erro de interpretação das informações do prontuário médico, classificando-a como livre de doença. Yang e colaboradores[66] reportaram também DNA de HPV transiente detectável 3 meses após o fim do tratamento e pacientes positivas nas coletas de seguimento, porém sem evidencias de recidiva. O significado do reaparecimento de DNA de HPV no plasma na ausência de recidiva da doença necessita de estudos futuros com maior período de seguimento[66].

A descrição dos cinco casos (caso 79, 98, 128, 135 e 83) de pacientes com câncer cervical deste estudo mostrou, de forma bem ilustrativa, a dinâmica da presença do DNA de HPV no plasma, que se torna positivo no momento do diagnóstico da doença, deixa de ser detectável após o término do tratamento com sucesso e que volta a ser detectável, antes ou no momento em que a doença volta a se manifestar, no caso de recidiva, ou continua a ser indetectável no plasma, no caso de resposta completa ao tratamento. Yang et al.[66] reportaram que a carga viral do DNA de HPV no plasma de pacientes com câncer cervical parece refletir a carga viral do tumor primário e parece estar relacionado com a resposta clínica, pois a carga viral mudou com o tratamento e progressão da doença, isto é, desapareceu em pacientes com resposta completa ao tratamento e persistiu em pacientes com persistência ou recidiva da doença, assim como foi reportado neste estudo.

Em alguns casos, a primeira coleta após o tratamento foi positiva para a presença de DNA de HPV no plasma e depois se manteve negativa nas coletas seguintes. A presença de DNA de HPV no plasma de pacientes tratadas por câncer cervical nos três primeiros meses pode ser oriunda de células tumorais que foram destruídas pelo tratamento (quimioterapia e/ou radioterapia). Após esse período, a presença de DNA de HPV no plasma possivelmente indica doença residual e que o tratamento tenha sido insuficiente.

No presente estudo verificou-se uma alta taxa de recidiva da doença (25%) e recidiva ou persistência da doença (35,3%). Segundo Elit et al.[7], a grande parte dos estudos de *follow-up* após tratamento de câncer cervical apresentaram taxas de recidiva variando entre 8% a 26% e são de estudos que analisaram apenas pacientes diagnosticadas com estádio IB e IIA, ou estudos com maior número de casos de estadiamento inicial precoce e poucos casos de estadios avançados. O único estudo que apresentou uma taxa de recidiva mais alta foi o de Morice et al.[125], no qual foram incluídas 31% de pacientes com doença avançada e onde a taxa de recidiva foi de 49% das pacientes. Uma justificativa para esta alta taxa de recidiva verificada no presente estudo pode ser dada pelo fato de ter um número de pacientes diagnosticadas em estadios mais avançados maior do que em estadios precoces (29,2 % de I e II e 70,8% de III e IV) e um tempo de seguimento variando de 3 a 4 anos, contribuindo para uma melhor análise do papel do DNA de HPV no plasma como biomarcador de recidiva da doença.

Uma limitação presente no estudo que pode ter diminuído as taxas de detecção de DNA de HPV no plasma, apesar de ter sido eficaz e ter apresentado dados próximos ao encontrado na literatura, foi a baixa sensibilidade dos testes de PCR em Tempo Real para ambos os tipos. Pela análise de Probit a sensibilidade da reação para HPV-16 foi de 8.121,8 cópias de HPV 16/mL e de 6.686,4 cópias de

HPV 18/mL para HPV-18. Alguns trabalhos que utilizaram também a metodologia de PCR em Tempo Real baseado em sistema TaqMan® empregando primers e sondas tipo-específicos para a região E6 do genoma de HPV-16 e 18 obtiveram melhor sensibilidade, detectando a presença de DNA de HPV-16 abaixo de 10 cópias de genoma HPV/ml e DNA de HPV-18 até 200 cópias de genoma HPV/ml usando plasmídeos como padrão[66, 88, 103].

Outra limitação, apesar de conseguirmos estabelecer uma associação entre presença de DNA no plasma e recidiva da doença, foi o número de pacientes incluídas no estudo abaixo do esperado (segundo N amostral) e a impossibilidade de se obter todas as coletas sequenciais de muitas das pacientes acompanhadas neste estudo, assim como de informações das pacientes, como geralmente acontece em estudos de acompanhamento, tornando mais difícil a nossa análise e comparações com outros estudos. Também não foi possível igualar o período de seguimento de todas as pacientes, uma vez que entraram no estudo ao longo dos anos de inclusão de casos. Mesmo assim, foi possível mostrar uma associação entre a presença de DNA de HPV no plasma de pacientes submetidas a tratamento com pior prognóstico da doença, sugerindo que o cf-DNA de HPV em pacientes com câncer cervical pode ter um valor como biomarcador.

Pelo que sabemos até o momento, este é o primeiro estudo brasileiro que buscou avaliar se a presença de DNA de HPV em amostras de plasma de mulheres diagnosticadas com câncer cervical tem valor como marcador precoce de recidiva da doença. Além disso, neste estudo foi utilizado o método de extração automatizada para obtenção de DNA de HPV em amostras de plasma, o qual evita contaminações, erros de manipulação e maior rendimento de DNA, por ser possível partir de volumes de amostras maiores. Até hoje, o que se tem disponível na literatura a respeito de DNA de HPV circulante e câncer cervical, são trabalhos que

utilizaram métodos de extração convencionais.

Assim, os achados deste estudo dão indícios que o DNA de HPV no plasma parece refletir a atividade biológica do tumor e pode, futuramente, ser um promissor biomarcador tumoral adicional, sendo complementar aos testes já disponíveis, auxiliando na detecção precoce de recidiva de câncer cervical e na conduta dos médicos oncologistas. Estudos futuros, com maior número de pacientes acompanhadas, maior tempo de seguimento e padronização de metodologias pré e pós-analíticas, são necessários para melhor avaliar a utilidade de um teste molecular não invasivo baseado na detecção de DNA de HPV no plasma, como um marcador tumoral em pacientes com câncer cervical a ser disponibilizado na prática clínica.

7 CONCLUSÃO

As observações deste trabalho nos permitem concluir que o teste de PCR em Tempo Real padronizado para HPV 16 e HPV 18 foi capaz de detectar o DNA de HPV no plasma de mulheres diagnosticadas com câncer cervical tanto no pré-tratamento (momento do diagnóstico) como em algumas amostras de seguimento. O teste de DNA HPV no plasma mostrou ter utilidade como marcador precoce de recidiva da doença após tratamento pela forte associação à recidiva da doença.

O DNA de HPV no plasma pré-tratamento foi detectado em 58,8% das pacientes diagnosticadas com câncer cervical e em 27,3% no plasma pós-tratamento.

Em alguns casos que apresentaram recidiva da doença, foi possível detectar o DNA de HPV no plasma de mulheres com recidiva de câncer cervical com até 460 dias antes da detecção clínica da doença.

A sensibilidade do teste de PCR em Tempo Real para HPV-16 e 18, determinada por análise de Probit, foi de 8.121,8 cópias de HPV 16/mL e 6.686,4 cópias de HPV 18/mL. O teste mostrou-se específico para ambos os tipos, porém o teste para HPV-16 precisa ter sua especifidade melhorada. A sensibilidade e a especificidade do teste, mesmo que não tenham apresentado parâmetros ideais, contribuíram para mostrar o papel do DNA plasmático como marcador de doença.

A estimativa de sobrevida global e tempo livre de doença mostraram significante associação entre a presença de DNA de HPV no plasma e recidiva da doença, indicando assim que nas pacientes diagnosticadas com câncer cervical e tratadas, a presença de HPV em amostras de plasma no seguimento pode ter um relevante valor como marcador precoce para o monitoramento da resposta

terapêutica e detecção de pacientes com risco aumentado de recidiva e progressão da doença. Estes achados apontam para que a detecção do HPV DNA no plasma possa ser um importante marcador prognóstico e diagnóstico quando usado tanto pré-tratamento (prognóstico) como pós-tratamento (diagnóstico de recidiva), representando um marcador adicional para agregar mais informações e auxiliar os médicos oncologistas.

REFERÊNCIAS

1. ICO. Human Papillomavirus and Related Diseases Report – World [Internet]. Information Centre on HPV and Cancer (ICO HPV Information Centre). Published online: 2015 [cited 2015]; Available from: http://www.hpvcentre.net/summaryreport.php.

2. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 2011;103(5):1-16.

3. WHO. Cancer of the cervix [Internet]. Published online: 2011 [cited 2012 Mar 15]; Available from: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en/index.html.

4. INCA - Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde do Brasil. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2015 [citado 2015 Nov 27]; Disponível em: http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/index.asp.

5. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2002 May;2(5):342-50.

6. Petignat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer. BMJ. 2007 Oct 13;335(7623):765-8.

7. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. Gynecol Oncol. 2009 Sep;114(3):528-35.

8. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. Cancer Metastasis Rev. 1999;18(1):65-73.

9. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. Clin Chim Acta. 2010 Nov 11;411(21-22):1611-24.

10. Chan KC, Lo YM. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. Br J Cancer. 2007 Mar 12;96(5):681-5.

11. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S, Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. BMC Cancer. 2001;1:2.

12. Widschwendter A, Blassnig A, Wiedemair A, Muller-Holzner E, Muller HM, Marth C. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker. Cancer Lett. 2003 Dec 30;202(2):231-9.

13. Knipe DM, Howley P. Papillomaviruses. In: Fields Virology. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

14. IARC. Cervix Cancer Screening [Internet]. IARC Handbooks of Cancer Prevention-WHO. Published online: 2005.

15. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gomez-Ceron C, Garcia-Suastegui WA, Fierros-Zarate Gdel S, Jacobo-Herrera NJ. HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. Obstet Gynecol Int. 2013; 2013:1-15.

16. Villa LL. Biology of genital human papillomaviruses. Int J of Gynecol Obstet. 2006;94(1):S3-S7.

17. Lambert PF. Papillomavirus DNA replication. J Virol. 1991 Jul;65(7):3417-20.

18. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. Front Microbiol. 2012;3:152. doi:10.3389/fmicb.2012.00152.

19. WHO/ICO. Information Centre on Human Papillomavirus (HPV) and Related Cancers –World. Summary Report Update[Internet]. Published online: 2010 [cited 2013 april 9]; Available from: http://www.hpvcentre.net/summaryreport.php.

20. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2007 Jul;7(7):453-9.

21. da Silva MC, Martins HP, de Souza JL, Tognim MC, Svidzinski TI, Teixeira JJ, et al. Prevalence of HPV infection and genotypes in women with normal cervical cytology in the state of Parana, Brazil. Arch Gynecol Obstet. 2012 Oct;286(4):1015-22.

22. Brito EB, Martins SJ, Menezes RC. Human papillomaviruses in Amerindian women from Brazilian Amazonia. Epidemiol Infect. 2002 Jun;128(3):485-9.

23. Camara GN, Cerqueira DM, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR. Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Oct;98(7):879-83.

24. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Mar;98(2):181-4.

25. Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. Gynecol Oncol. 2004 Jan;92(1):225-31.

26. Queiroz C, Travassos AG, Studart E, Araujo Filho JB, Sarno CK, Pinheiro CC. Prevalence of human Papilloma Virus in HIV-positive and HIV-negative patients in the State of Bahia: a pilot study. Braz J Infect Dis. 2004 Oct;8(5):356-62.

27. Carvalho MO, Carestiato FN, Perdigao PH, Xavier MP, Silva K, Botelho MO, et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. Braz J Infect Dis. 2005 Oct;9(5):398-404.

28. Tozetti IA, Scapulatempo ID, Kawski VL, Ferreira AW, Levi JE. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. Braz J Infect Dis. 2006 Oct;10(5):309-10.

29. Pereira CR, Rosa ML, Vasconcelos GA, Faria PC, Cavalcanti SM, Oliveira LH. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. Int J Gynecol Cancer. 2007 May-Jun;17(3):651-60.

30. Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2007 Sep-Oct;49(5):297-301.

31. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. Lancet Oncol. 2009 Apr;10(4):321-2.

32. IARC. Human Papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2007; vol 90[Internet]. Published online: 2007. Lyon, France; Available from: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/.

33. Oliveira CM, Aguiar, L.S., Genta, M.L.D.N., Alves, V.A.F, Levi, J.E. HPV-11 associated metastatic cervical câncer. Gynec Oncol Reports 2012;2:18-9.

34. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol. 2010 Nov;11(11):1048-56.

35. De Vuyst H, Gichangi P, Estambale B, Njuguna E, Franceschi S, Temmerman M. Human papillomavirus types in women with invasive cervical carcinoma by HIV status in Kenya. Int J Cancer. 2008 Jan 1;122(1):244-6.

36. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3316-22.

37. Anic GM, Lee JH, Stockwell H, Rollison DE, Wu Y, Papenfuss MR, et al. Incidence and human papillomavirus (HPV) type distribution of genital warts in a multinational cohort of men: the HPV in men study. J Infect Dis. 2011 Dec 15;204(12):1886-92.

38. Chan PK, Luk AC, Luk TN, Lee KF, Cheung JL, Ho KM, et al. Distribution of human papillomavirus types in anogenital warts of men. J Clin Virol. 2009 Feb;44(2):111-4.

39. Oliveira CM, Levi JE. Low and high-oncogenic risk Human Papillomaviruses: every rule has its execption. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2011;23(4):174-6.

40. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology. 2004 Jun 20;324(1):17-27.

41. Borruto F, Comparetto C. Treatment, Follow-up, and Prevention of Papillomavirus Infection and Cervical Cancer. In: Borruto F, Ridder Marc De (org). HPV and Cervical Cancer: Achievements in Prevention and Future Prospects. New York, USA: Springer. 2012; p 273-326.

42. zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. Proc Assoc Am Physicians. 1999 Nov-Dec;111(6):581-7.

43. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K1-16.

44. Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer. Curr Oncol Rep. 2002 Mar;4(2):175-83.

45. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer. 2007 Jan;7(1):11-22.

46. Santos NSO, Romanos M, Wigg MD. Vírus do Papiloma Humano (HPV). In: Introdução à Virologia Humana. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2002;p. 204-10.

47. WHO. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines [Internet]. Published online: 2002; 2nd edition, Genova. Available from: http://www.who.int/cancer/publications/nccp2002/en/.

48. WHO. Prevention: Cancer Control. Knowledge into Action. WHO guide for effective programmes, module 2 [Internet]. Published online: 2007 [cited 2014 april 2] Switzerland; Available from: http://www.who.int/cancer/modules/Prevention%20Module.pdf.

49. INCA - Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde do Brasil. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero [Internet]. 2011, Rio de Janeiro [citado 2013 mai 20]; Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Diretrizes.PDF.

50. Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. Lancet. 2014 Feb 8;383(9916):524-32.

51. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. N Engl J Med. 2007 Oct 18;357(16):1579-88.

52. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. J Clin Virol. 2005 Mar;32 Suppl 1:S43-51.

53. van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3122-9. doi: 10.1128/JCM.00517-06.

54. Jacob M. HPV Vaccines: Characteristics, Target Population and Safety. FIGO Global Guidance For Cervical Cancer Prevention and Control; 2009 Oct; 5 chap: 15-21.

55. Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 10:K53-61.

56. Gattoc L, Nair N, Ault K. Human papillomavirus vaccination: current indications and future directions. Obstet Gynecol Clin North Am. 2013 Jun;40(2):177-97.

57. Sadalla JC, Andrade JM, Genta ML, Baracat EC. Cervical cancer: what's new? Rev Assoc Med Bras. 2015 Dec;61(6):536-42.

58. Ngan HYS. FIGO: Global Guidance for Cervical Cancer Prevention and Control. FIGO Cancer Committee Guidelines for Early Invasive Cervical Cancer Management; 2009 Oct, cap. 15-16 p. 68-71.

59. Tavares MB, Sousa RB, Oliveira e Silva T, Moreira LA, Silva LT, Tavares CB, et al. Prevalence of prognostic factors for cancer of the uterine cervix after radical hysterectomy. Sao Paulo Med J. 2009;127(3):145-9.

60. Bodurka-Bevers D, Morris M, Eifel PJ, Levenback C, Bevers MW, Lucas KR, et al. Posttherapy surveillance of women with cervical cancer: an outcomes analysis. Gynecol Oncol. 2000 Aug;78(2):187-93.

61. Yu MC, Austin RM, Lin J, Beck T, Beriwal S, Comerci JT, et al. The Role of High-Risk Human Papilloma Virus Testing in the Surveillance of Cervical Cancer After Treatment. Arch Pathol Lab Med. 2015 Nov;139(11):1437-40.

62. Zola P, Fuso L, Mazzola S, Piovano E, Perotto S, Gadducci A, et al. Could follow-up different modalities play a role in asymptomatic cervical cancer relapses diagnosis? An Italian multicenter retrospective analysis. Gynecol Oncol. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S150-4.

63. Sartori E, Pasinetti B, Carrara L, Gambino A, Odicino F, Pecorelli S. Pattern of failure and value of follow-up procedures in endometrial and cervical cancer patients. Gynecol Oncol. 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S241-7.

64. Duyn A, Van Eijkeren M, Kenter G, Zwinderman K, Ansink A. Recurrent cervical cancer: detection and prognosis. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002 Aug;81(8):759-63.

65. Mabuchi S, Isohashi F, Maruoka S, Hisamatsu T, Takiuchi T, Yoshioka Y, et al. Post-treatment follow-up procedures in cervical cancer patients previously treated with radiotherapy. Arch Gynecol Obstet. 2012 Jul;286(1):179-85.

66. Yang HJ, Liu VW, Tsang PC, Yip AM, Tam KF, Wong LC, et al. Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. Int J Gynecol Cancer. 2004 Sep-Oct;14(5):903-10.

67. Roncaglia MT. Valor da captura híbrida para o papilomavirus humano (HPV) no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino devido à lesão intraepitelias de alto grau por cirurgia de alta freqüência (CAF). São Paulo: FMUSP - Universidade de São Paulo; 93 p. Tese [Doutorado] – Programa de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

68. Roncaglia MT, Tacla M, Vieira da Motta E, Caiaffa H, Ab'Saber A, Alves VA, et al. Evaluation of the combination of cytology and hybrid capture to safely predict the high-grade lesion status of patients treated with conization with large loop excision of the transformation zone. Acta Cytol.2011;55(5):421-5.

69. Wong BC, Lo YM. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Nov;3(6):785-97.

70. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. Eur J Cancer Clin Oncol. 1987 Jun;23(6):707-12.

71. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. Oncology. 1989;46(5):318-22.

72. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013 Aug;10(8):472-84.

73. Marzese DM, Hirose H, Hoon DS. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. Expert Rev Mol Diagn. 2013 Nov;13(8):827-44.

74. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol. 2014 Feb 20;32(6):579-86.

75. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):112-23. doi: 10.1373/clinchem.2014.222679

76. Mandel P Métais P. Les acids nucléiques du plasma sanguine chez l´homme. C R Acad Sci Paris. 1948;142:241-3.

77. Swaminathan R, Butt AN. Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. Ann N Y Acad Sci. 2006 Sep;1075:1-9.

78. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1966 Nov;45(11):1732-40.

79. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977 Mar;37(3):646-50.

80. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. J Clin Invest. 1973 Jan;52(1):198-204.

81. Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;945:1-7.

82. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 2011 Jun;11(6):426-37.

83. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? Lung Cancer. 2005 Jul;49(1):1-12.

84. Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. Lancet. 1990 Jun 16;335(8703):1463-4.

85. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. Lancet. 1993 May 1;341(8853):1147-8.

86. Romão RM, Levi J, de Carvalho MHB, Francisco RPV, Filho AGA, Zugaib M. Utilização dos ácidos nucléicos fetais livres no plasma materno para o diagnóstico pré-natal: realidade do Brasil neste cenário. Rev Assoc Med. 2012;58(5):615-9.

87. Snyder TM, Khush KK, Valantine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 12;108(15):6229-34.

88. Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Rajasekar A, Gravitt P, et al. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. Gynecol Oncol. 2010 Mar;116(3):447-51.

89. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. Anal Bioanal Chem. 2014 Oct;406(26):6499-512.

90. Dahlstrom KR, Li G, Hussey CS, Vo JT, Wei Q, Zhao C, et al. Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. Cancer. 2015 Oct 1;121(19):3455-64.

91. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1999 Mar 15;59(6):1188-91.

92. Lo YM, Chan AT, Chan LY, Leung SF, Lam CW, Huang DP, et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. Cancer Res. 2000 Dec 15;60(24):6878-81.

93. Chan AT, Lo YM, Zee B, Chan LY, Ma BB, Leung SF, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. J Natl Cancer Inst. 2002 Nov 6;94(21):1614-9.

94. Lin JC, Wang WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. N Engl J Med. 2004 Jun 10;350(24):2461-70.

95. Leung SF, Zee B, Ma BB, Hui EP, Mo F, Lai M, et al. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma. J Clin Oncol. 2006 Dec 1;24(34):5414-8.

96. Liu VW, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC, Ngan HY. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. Gynecol Oncol. 2001 Aug;82(2):269-72.

97. Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Jan;11(1):3-6.

98. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Shaji RV, et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. J Clin Virol. 2004 Nov;31(3):204-9.

99. Singh RK, Maulik S, Mitra S, Mondal RK, Basu PS, Roychowdhury S, et al. Human papillomavirus prevalence in postradiotherapy uterine cervical carcinoma patients: correlation with recurrence of the disease. Int J Gynecol Cancer. 2006 May-Jun;16(3):1048-54.

100. Duenas A, Lizano M, Carrillo AL, Wojcik J, Trejo C. DNA of human papillomavirus detected by PCR in plasma of cervical cancer patients: a potential marker of residual disease. Clin Chem. [Abstract]. 2001;47:361-70.

101. Jaberipour M, Samsami A, Sahraiian F, Kazerooni T, Hashemi M, Ghaderi A, et al. Elevation of HPV-18 and HPV-16 DNA in the plasma of patients with advanced cervical cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2011;12(1):163-7.

102. Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. Gynecol Oncol. 2005 Dec;99(3):615-21.

103. Wei YC, Chou YS, Chu TY. Detection and typing of minimal human papillomavirus DNA in plasma. Int J Gynaecol Obstet. 2007 Feb;96(2):112-6.

104. Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with HPV16 DNA-positive uterine cervical cancer. Jpn J Clin Oncol. 2010 May;40(5):420-4.

105. Arias Y, Carrillo E, Aristizabal F. Human papillomavirus (HPV) detected in restored plasma DNA from women diagnosed with pre-invasive lesions and invasive cervical cancer [Internet]. Published online: 2010 Jun [cited 2013 oct 15]. Colombia Medica, North America. 2010 apr-jun;41(2):148-54. Available from:<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/696>

106. Hsu KF, Huang SC, Hsiao JR, Cheng YM, Wang SP, Chou CY. Clinical significance of serum human papillomavirus DNA in cervical carcinoma. Obstet Gynecol. 2003 Dec;102(6):1344-51.

107. Mutirangura A. Serum/plasma viral DNA: mechanisms and diagnostic applications to nasopharyngeal and cervical carcinoma. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;945:59-67.

108. Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2000 Nov;6(11):4171-5.

109. Ahn SM, Chan JY, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2014 Sep;140(9):846-54.

110. Cao H, Banh A, Kwok S, Shi X, Wu S, Krakow T, et al. Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012 Mar 1;82(3):e351-8.

111. Chiou HL, Wu MF, Liaw YC, Cheng YW, Wong RH, Chen CY, et al. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. American Cancer Society. 2003 Mar 15;97(6):1558-63.

112. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. Biochim Biophys Acta. 2007 Jan;1775(1):181-232.

113. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-

DNAplas External Quality Assessment experience. Clin Chem Lab Med. 2015 Nov 1;53(12):1935-42.

114. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Clin Chim Acta. 2013 Sep 23;424:222-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>.

115. Pinzani P, Salvianti F, Pazzagli M, Orlando C. Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy. Methods. 2010 Apr;50(4):302-7.

116. Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease. Ann N Y Acad Sci. 2008 Aug;1137:207-13.

117. Oliveira CM. Existe câncer cervical HPV negativo? São Paulo: FMUSP - Universidade de São Paulo; 2011. 106 p. Tese [Doutorado]. São Paulo(SP): Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

118. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. Int J Gynaecol Obstet. 2009 May;105(2):103-4.

119. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Annu. 1973;8:301-28.

120. IARC Screening Group. WHO histological classification of tumours of the uterine cervix [Internet]. Published online: 2015 [cited 2015]; Available from: http://screening.iarc.fr/atlasclassifwho.php?lang=1.

121. Frappart L, Fontanière B, Lucas E, Sankaranarayanan R. Histopathology and cytopathology of the uterine cervix. Digital Uterine Cervix Histopathology and Cytopathology Atlas of Basic Reference. 2004 [updated 2004; cited 2015 apr 15]; CD-ROM. Available from: http://screening.iarc.fr/atlashisto.php.

122. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

123. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EA, de Kok JB. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. Clin Chem. 2003 Mar;49(3):525-6.

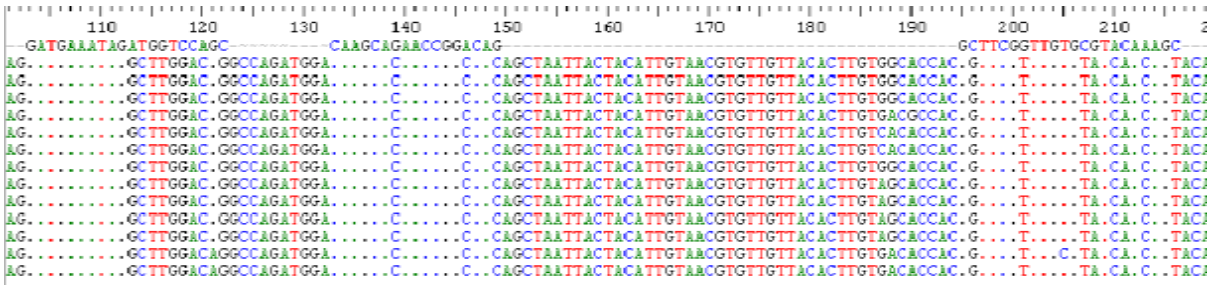
124. Lo YM, Chan LY, Chan AT, Leung SF, Lo KW, Zhang J, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1999 Nov 1;59(21):5452-5.

125. Morice P, Deyrolle C, Rey A, Atallah D, Pautier P, Camatte S, et al. Value of routine follow-up procedures for patients with stage I/II cervical cancer treated with combined surgery-radiation therapy. Ann Oncol. 2004 Feb;15(2):218-23.

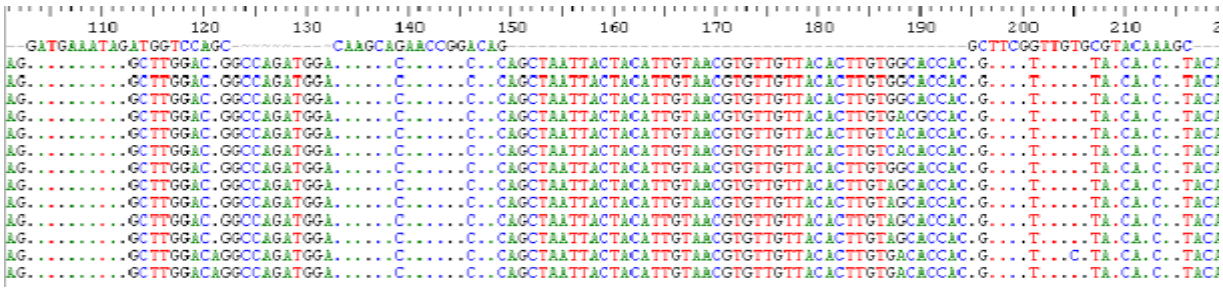
ANEXO A – ALINHAMENTOS DA REGIÃO E7 DE HPV-16

Figura 1: Alinhamento de nucleotídeos da região E7 de diferentes tipos de HPV com os iniciadores e sonda específicos para a região E7 de HPV-16

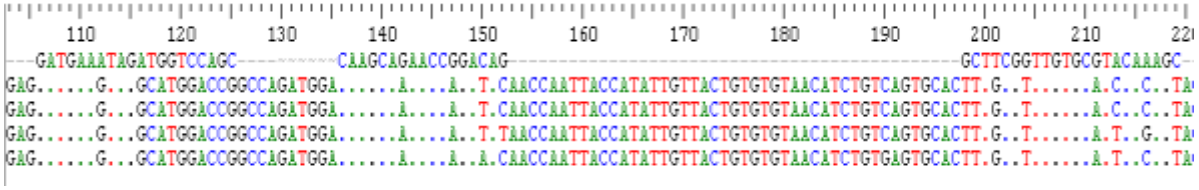
1.1. Sequências de HPV- 31



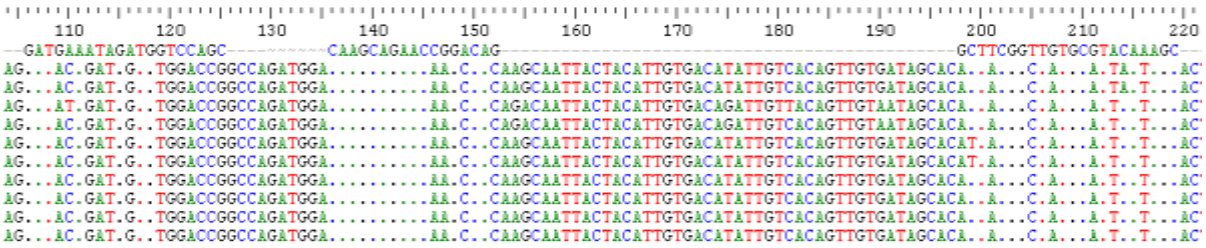
1.2. Sequências de HPV- 58



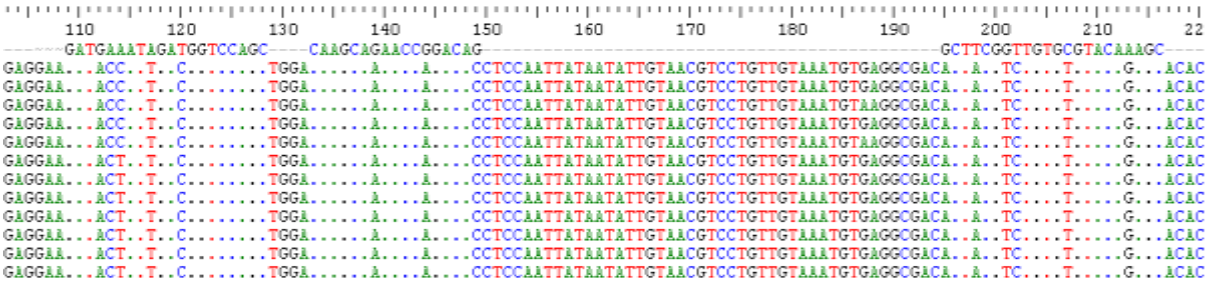
1.3. Sequências de HPV- 67



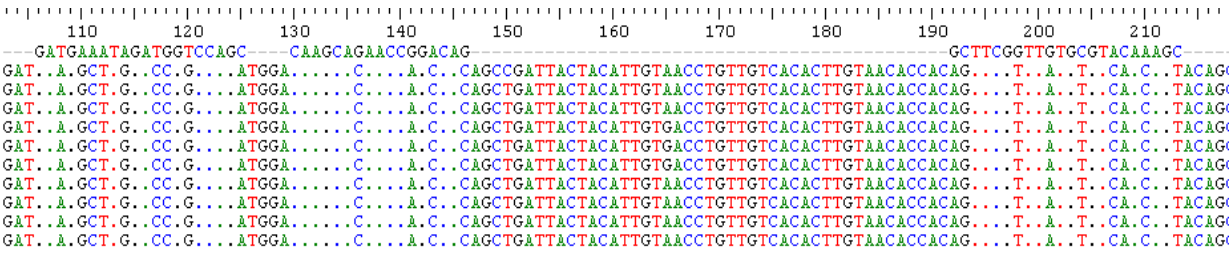
1.4. Sequências de HPV- 52



1.5. Sequências de HPV- 35



1.6. Sequências de HPV- 33



ANEXO B – TCLE HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HOSPITAL DAS CLÍNICAS/SP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº.....

APTO:..... BAIRRO.....

CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº .....APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Padronização e validação de PCR em tempo real para detecção do DNA do HPV no plasma em mulheres com câncer de colo de útero

PESQUISADOR: José Eduardo Levi

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 23.407/01-D (CRBio)

UNIDADE DO HCFMUSP: Depto. De Moléstias Infecciosas LIM 52

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	■	RISCO MÉDIO	□
RISCO BAIXO	□	RISCO MAIOR	□

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 5 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O objetivo desta pesquisa é testar um novo método de diagnóstico do câncer de útero usando amostra de sangue. Como a Sra. sabe, o diagnóstico desta doença normalmente é feito pelo exame citológico (Papanicolaou) seguido de outros testes como a colposcopia e a biópsia. Este estudo poderá ajudar pacientes com câncer de útero para o acompanhamento de possível recidiva (volta do câncer após o tratamento) e mesmo mulheres que não sabem que estão com câncer poderão ser beneficiadas.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

Não será realizado nenhum procedimento além daqueles necessários conforme a determinação do seu médico. Precisaremos de uma pequena amostra

de sangue da Sra. e também obteremos um fragmento da biópsia já solicitada por seu médico.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados –

Será feita a coleta de sangue da veia do braço, ou seja, após a limpeza, a pele é furada com a agulha até atingir a veia, empregando tubo de coleta a vácuo, o sangue flui naturalmente para o tubo. Serão coletados apenas 5 mL para o propósito desta pesquisa.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Não se espera nenhum desconforto além da pequena dor causada pela picada da agulha no antebraço.

5 – Benefícios para o participante. Não há benefício direto para o participante. Trata-se ainda de um estudo para ver se o teste é capaz de detectar o câncer de útero usando amostra de sangue. A Sra. está sendo convidada a contribuir porque já tem um diagnóstico conclusivo de câncer de útero.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, a Sra. terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de suas dúvidas. O investigador principal é o Dr José Eduardo Levi que pode ser encontrado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo na Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 2º andar, CEP 05403-000 Telefone(s) 11 3062 2645 ramal 110, e-mail dudilevi@usp.br. Se a sra. tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

13 - Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ".Padronização e validação de PCR em tempo real para detecção do DNA do HPV no plasma em mulheres com câncer de colo de útero"
Eu discuti com a Dra. MARIA LUIZA NOGUEIRA GENTA e/ou Prof. Dr. JESUS PAULA CARVALHO sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a

qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

ANEXO C – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO

Tumor Biol. (2015) 36:5399–5405
DOI 10.1007/s13277-015-3205-9

RESEARCH ARTICLE

Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA

Carlos A. R. Veo · Sarhan S. Saad · José Humberto T. G. Fregnani · Cristovam Scapulatempo-Neto · Audrey Tieko Tsunoda · Júlio César Possati Resende · Adriana Tarlá Lorenzi · Allini Mafra · Claudia Cinti · Ismael Dale Cotrim · Luciana Albina Reis Rosa · Cristina Mendes de Oliveira · Toni Ricardo Martins · Cristiane Centrone · José Eduardo Levi · Adhemar Longatto-Filho

Received: 25 August 2014 / Accepted: 3 February 2015 / Published online: 13 February 2015
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

Abstract High-risk human papillomavirus (hrHPV) is an essential cause of cervical carcinoma and is also strongly related to anal cancer development. The hrHPV E6 oncoprotein plays a major role in carcinogenesis. We aimed to evaluate the frequency of hrHPV DNA and E6 oncoprotein in the anuses of women with cervical carcinoma. We analyzed 117 women with cervical cancer and 103 controls for hrHPV and the E6 oncogene. Positive test results for a cervical carcinoma included 66.7 % with hrHPV-16 and 7.7 % with hrHPV-18. One case tested positive for both HPV variants (0.9 %). The samples from the anal canal were positive for HPV-16 in 59.8 % of the cases. Simultaneous presence of HPV in the cervix and anal canal was found in 53.8 % of the cases. Regarding expression of E6 RNA, positivity for HPV-16 in the anal canal was found in 21.2 % of the cases, positivity for HPV-16 in the cervix was found in 75.0 %, and positivity for HPV-18 in the cervix was found in 1.9 %. E6 expression in both the cervix and anal canal was found in 19.2 % of the cases. In the controls, 1 % tested positive for HPV-16 and 0 % for HPV-18. Anal samples from the controls showed a hrHPV frequency of 4.9 % (only HPV16). The presence of hrHPV in the anal canal of women with cervical cancer was detected at a high frequency. We also detected E6 RNA expression in the anal canal of women with cervical cancer, suggesting that these women are at risk for anal hrHPV infection.

Keywords HPV · Cervical cancer · Anus · HPV E6 · HPV DNA · HPV RNA

C. A. R. Veo · J. H. T. G. Fregnani · C. Scapulatempo-Neto · A. T. Tsunoda · J. C. P. Resende · A. Mafra
Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil

S. S. Saad
Department of Gastroenterology, Medical School of the Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

J. H. T. G. Fregnani · A. T. Lorenzi · A. Longatto-Filho
Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil

C. Cinti · I. D. Cotrim
Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

L. A. R. Rosa · C. M. de Oliveira · T. R. Martins · C. Centrone · J. E. Levi
Laboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

A. Longatto-Filho (✉)
Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14, Faculty of Medicine, University of São Paulo, 1246-903 São Paulo, Brazil
e-mail: longatto16@hotmail.com

A. Longatto-Filho
Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal

A. Longatto-Filho
ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory

Background

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (hrHPV) is strongly associated with the development of gynecological and non-gynecological cancers [1, 2]. Cervical cancer has been studied extensively, and it has been established that hrHPV infection is a significant cause of cervical carcinogenesis [3]. Current HPV testing, vaccinations, and cytology examination are expected to enhance the quality of cervical cancer prevention programs [4]. Well-conducted

ANEXO D – APRESENTAÇÃO DE PÔSTER

29th International Papillomavirus Conference and Public Health & Clinical Workshops
Pre-Conference Workshops: August 20– 21, 2014
Main Conference: August 21– 25, 2014
Washington State Convention Center
Seattle, Washington, USA
www.hpv2014.org

Clinical Science Poster Abstracts

CS.PP03.03

DETECTION OF HPV DNA IN PLASMA SAMPLES OF WOMEN WITH INVASIVE CERVICAL CANCER (ICC) FROM SAO PAULO, BRAZIL.

Cristiane Centrone (1), Cristina Oliveira (1), José Humberto Fregnani (2), Adhemar Longatto-Filho (3), Jesus Carvalho (4), José Eduardo Levi (1), *(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, (2) Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, São Paulo, Brazil, (3) CPMO - Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, São Paulo, Brazil, (4) Setor de Ginecologia Oncológica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto do Câncer de São Paulo "Octávio Frias de Oliveira", São Paulo, São Paulo, Brazil*

Invasive cervical cancer is the second most prevalent malignancy in Brazilian women with an incidence of 18.4/100,000 women. Predictive biomarkers are an important source of information assisting the management of cancer patients. Circulating cell-free DNA (cf-DNA) represents a non-invasive biomarker easily obtained from body fluids. Several studies show that it is possible to detect and quantify nucleic acids in the plasma of patients with cancer. The alterations found in cf-DNA potentially reflect changes that occur during carcinogenesis. Therefore, the development and standardization of noninvasive laboratory tests capable of identifying tumor markers and diagnose disease recurrence in early stage is of great interest because it may increase the chance of cure through earlier intervention. Objective: To detect the presence of HPV 16 and 18 in the plasma of patients with ICC. Methods: A fragment of tumor and a tube of whole blood with separating gel from 178 women attending two cancer treatment centers from Brazil were collected before treatment. DNA extracted from tumor and plasma samples was submitted to HPV 16 and 18 type specific real-time PCR study. Results: Out of the 178 tumor samples, 135 (87.4%) were HPV16 positive, 12 (8.8%) HPV18 positive and 5 (3.7%) positive for both HPV types. Plasma samples from 111 of these 135 HPV positive samples were tested by qPCR and the presence of HPV16 DNA was observed in 54.0% (54/100) and HPV18 in 56.25% (9/16) of pre-treatment plasma samples, with viral loads ranging from 204 copies/mL to 964,500 copies/mL. HPV DNA detection in plasma increased as the disease's clinical stage increased (Stage I–42%, II–49%, III–81%, IV–70%). Conclusion: We were able to detect and quantify the HPV DNA in pre-treatment plasma samples using qPCR which will permit evaluate the treatment status of these patients in follow-up. Thanks to FAPESP08/57889-1 and CNPq573799/2008-3 for the financial support.
Contact: Cristiane Centrone, cris.centrone@gmail.com