Luiz Mário Santos Fuza

**Comparação entre testes de detecção de HPV com
alvos em E6/E7 e L1 em tumores cervicais invasivos**

Dissertação apresentada ao 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: Prof. Dr. José Eduardo Levi

**São Paulo
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Fuza, Luiz Mário Santos

Comparação entre testes de detecção de HPV com alvos em E6/E7 e L1 em tumores cervicais invasivos / Luiz Mário Santos Fuza. – São Paulo, 2017.

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. NEOPLASIAS DO COLO UTERINO. 2. HPV. 3. RASTREAMENTO. 4. REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE. 5. INTEGRAÇÃO..

USP/IMTSP/BIB-26/2017.

Dedico à minha filha Maria Luíza, que nasceu no decorrer deste
estudo, trazendo muitas felicidades para a família e por ser um
dos motivos de todos meus esforços

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu orientador, Prof Dr José Eduardo Levi (Dudi), pela disponibilidade, paciência e profissionalismo.

Ao Prof José Eluf Neto, pelo incentivo à pesquisa, pela oportunidade da realização de parte deste estudo na FOSP e pelo apoio.

À Diane Dede Cohen, pelo apoio, compreensão, encorajamento em momentos difíceis, sendo meu braço direito nessa caminhada.

À minha esposa Marion, pela paciência em momentos de estresse e incentivo.

À minha mãe Vera e meu pai Carlos, por terem me ensinado que estudar enobrece o homem.

À minha irmã Aline, por sempre acreditar em mim, em tudo que eu me presto a fazer.

À Profª Drª Luisa Lina Villa, do INCT-HPV, por ceder os testes com INNO-LiPA, possibilitando a execução do estudo e por estar sempre disposta a ajudar com seu altíssimo conhecimento na área.

Ao Prof Dr Adhemar Longatto Filho, pela disponibilidade em apoiar o estudo.

À Drª Barbara Melo, do INCT-HPV, pela ajuda na execução dos ensaios de PCR com INNO-LiPA, e por passar um pouco do seu conhecimento técnico para mim.

A todo o pessoal do laboratório da FOSP, especialmente Mércia Pacheco, Cidinha e Dr Alexandre Muxfeldt Ab`Saber, pelo incentivo e colaboração nas minhas ausências.

À Jéssica e Luciana, do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, pela ajuda com a PCR.

À empresa Becton Dickinson, por fornecer os equipamentos e doar os reagentes para realização dos testes para genotipagem de HPV.

Aos membros da banca de qualificação, Dr^a Thaís Heinke e Prof^a Dr^a Ester Sabino, pelas sugestões e apoio.

Ao Dr Toni Ricardo Martins, amigo e companheiro nesta jornada, pelas horas de bancada juntos, pelas risadas e pelo incentivo no mestrado.

À Dr^a Maria Luiza Genta (Malu), pela cessão das amostras do seu doutorado, e pelas explicações, quando necessárias.

Ao Ricardo Góes, pela essencial ajuda na formatação do texto.

Aos colegas do IMT, pela amizade e cumplicidade nessa caminhada.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

“Você ganha força, coragem e confiança
através de cada experiência em que você
realmente para e encara o medo de frente”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Fuza LMS. Comparação entre testes de detecção de HPV com alvos em E6/E7 e L1 em tumores cervicais invasivos. (Dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

O carcinoma cervical invasivo é o terceiro tipo de câncer que mais acomete as mulheres no mundo, sendo responsável por 270 mil óbitos por ano. Estudos multicêntricos puderam identificar a presença do DNA do HPV em quase 100% dos carcinomas cervicais, estando já bem esclarecido que o papilomavírus humano (HPV) é causa para o câncer cervical, sendo fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença. A melhor forma de evitar o câncer de colo do útero é a prevenção. Considera-se como prevenção primária a vacina anti-HPV e, como prevenção secundária, o rastreamento de lesões precursoras do câncer, seja pela citologia oncológica ou o rastreamento molecular. Este último, por identificar a presença de DNA de HPV de alto risco oncogênico, tem se mostrado a maneira mais eficaz. Existem dúvidas sobre o melhor teste a ser usado para este tipo de rastreamento, uma vez que existem ensaios distintos que identificam diferentes genes alvo, considerando-se que, durante o processo de integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro, pode ocorrer a perda de qualquer um dos genes virais. Este pode ser um dos motivos de alguns tumores cervicais apresentarem resultados falsos negativos para HPV. Neste trabalho foram utilizadas 57 amostras de câncer cervical confirmadas no exame anatomopatológico, negativas para HPV na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™*, cujo gene alvo é E6/E7 e positivas para beta-globina humana, provenientes de um estudo anterior. Usando o restante do DNA já extraído, essas amostras foram genotipadas no sistema *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II™*, que tem como alvo o gene *L1*. Como controle, foram testadas mais 27 amostras cujo resultado foi positivo para algum tipo de HPV de alto risco naquela plataforma. Para tanto, selecionamos a amostra seguinte a cada uma das amostras negativas, cujo resultado fosse positivo. Nosso principal achado foi a constatação de que a concordância entre os dois métodos testados é boa (Kappa 70). Das 84 amostras genotipadas nas duas plataformas, 64 (76,2%) tiveram os mesmos resultados, sendo 26 negativas, 15 inadequadas e 23 positivas. No entanto, 20 amostras (23,8%) tiveram resultados discordantes. Para tentar esclarecer estes casos, foi realizado o ensaio de PCR em tempo real para HPV 16 com alvo em E7 em 4 amostras positivas para HPV nos dois métodos e 2 amostras com resultado de HPV 16 apenas em um dos ensaios. Nenhum dos testes deste estudo pôde chegar a 100% de positividade nestes tumores cervicais, apesar da histologia realizada pelo setor de anatomia patológica do ICESP ter confirmado serem todos tumores primários do colo do útero. Assim sendo, sugerimos que esses resultados falsos negativos podem ser devidos a problemas na coleta do material, na preservação ou dificuldade dos métodos detectarem HPV em amostras fixadas em formol e embebidas em parafina, hipótese reforçada pela concordância obtida nos casos considerados inadequados para análise pelos dois métodos.

Descritores: 1. Neoplasias do colo uterino. 2. HPV 3. Rastreamento. 4. PCR. 5. Integração.

ABSTRACT

Fuza LMS. Comparison of HPV detection tests with E6 / E7 and L1 targets in invasive cervical tumors. (Dissertation). São Paulo: Institute of Tropical Medicine of the University of São Paulo; 2017.

Invasive cervical carcinoma is the third most common form of cancer in the world, accounting for 270,000 deaths per year. Multicenter studies have identified the presence of HPV DNA in almost 100% of cervical carcinomas, and it is well established that human papillomavirus (HPV) is cause of cervical cancer, being necessary, but not sufficient to the development of the disease. The best way to avoid cervical cancer is prevention. Primary prevention is the anti-HPV vaccine, and secondary prevention the screening of cancer precursor lesions, by either oncotic cytology or molecular screening, to identify the presence of high-risk oncogenic HPV. There are questions as to which test should be used for this type of screening, since they use different target genes, knowing that during the integration of the HPV genome into the host genome, any of the viral genes can be deleted . This may be one reason some cervical tumors have false negative results for HPV. In this work, we evaluated 57 samples of cervical cancer, confirmed by anatomic pathological examination, negative for HPV on the BD Onclarity HPV Assay™ platform, whose target is the E6 / E7 gene and positive for beta-globin, from a previous study using the remaining extracted DNA. These samples were genotyped by the INNO-LiPA HPV Genotyping Extra system, with target in L1 gene. As controls, we tested another 27 samples that were positive for some type of high-risk HPV on that platform. To do so, we selected the following sample to each of the negative samples, whose result was positive. Our main finding was that the results of the two methods were in good concordance (Kappa 70). Of the 84 genotyped samples in both platforms, 64 (76.2%) had the same results, 26 were negative, 15 inadequate and 23 were positive. Twenty samples (23.8%), however, presented different results. In the attempt to clarify the discordant cases, we performed real-time PCR for HPV 16 with E7 target, in four HPV positive samples in both methods, and two positive in only one of the assays. None of the tests in this study could reach 100% positivity in these cervical tumors, although the histology performed by ICESP's pathology department has confirmed that they were all primary tumors of the cervix. Therefore, these false negative results may be due to problems in the sample collection, preservation or difficulty of the methods to detect HPV DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded samples, a hypothesis reinforced by the agreement obtained in cases considered unsuitable for analysis by the two methods.

Descriptors: 1. Neoplasms of the cervix. 2. HPV. 3. Screening. 4. PCR. 5. Integration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1. Estimativa de câncer no Brasil em 2016	13
Quadro 2. Testes comercialmente disponíveis em 2012.....	23
Quadro 3. Comparação entre os resultados e valores de cTs dos testes para HPV 16	50

FIGURAS

Figura 1. Genoma do HPV	16
Figura 2. Infecção do epitélio pelo HPV	17
Figura 3. Aquecedor BD <i>Pre Warm</i>	31
Figura 4. Tubos para PCR na plataforma BD <i>Onclarity HPV Assay</i> , e os genótipos que cada um identifica.....	33
Figura 5. Placa de PCR montada para 30 amostras e 2 controles	34
Figura 6. Equipamento Viper LT™ da BD usado com a plataforma <i>BD Onclarity HPV assay™</i> para detecção e genotipagem de HPVs de alto risco oncogênico.....	35
Figura 7. Termociclador Autoblot-3000 (FUJIREBIO, Europa)	37
Figura 8. Tiras de nylon para identificação dos genótipos no ensaio com INNO-LiPA	38
Figura 9. Gráfico usado para interpretação dos resultados do ensaio com INNO-LiPA.....	39
Figura 10. Iniciadores usados para amplificação do HPV 16	39
Figura 11. Termociclador Quantstudio™ 5 System (Applied Biosystems, Inc., EUA)	41
Figura 12. Gráfico da amplificação das amostras após os ciclos de temperatura ...	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras E6/E7 negativas por faixa etária das pacientes e tipo histológico do tumor	43
Tabela 2. Distribuição das amostras E6/E7 positivas por faixa etária das pacientes e tipo histológico do tumor	44
Tabela 3. Resultados do ensaio com E6/E7 agrupados em relação ao tipo histológico do tumor.....	44
Tabela 4. Resultados do teste com L1 agrupados em relação ao tipo histológico do tumor	45
Tabela 5. Distribuição das amostras, considerando os resultados positivos agrupados, com os testes L1 e E6/E7	46
Tabela 6. Distribuição das amostras, considerando os resultados positivos agrupados, com os testes L1 e E6/E7 (exclui amostras não válidas).....	46
Tabela 7. Distribuição das amostras por resultado específico com os testes para L1 e E6/E7.....	47
Tabela 8. Distribuição dos resultados com L1 das amostras E6/E7 negativas por tipo histológico do tumor.....	48
Tabela 9. Distribuição dos resultados nos ensaios com L1 e E6/E7, considerando HPV 16/18 e demais positivos agrupados	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Adenocarcinoma
CEC	Carcinoma Escamocelular
CT	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E	<i>Early</i>
ET	Conteúdo insuficiente
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HC2	<i>Hybrid Capture 2</i>
HPV	Papilomavírus humano
HrHPV	Papilomavírus humano de alto risco
IC	Falha no controle interno
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	<i>Late</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
Mrna	Ácido ribonucléico mensageiro
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PB	Par de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
USPSTF	<i>U.S. Preventive Services Task Force</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Epidemiologia do Câncer Cervical	13
1.2 HPV e Câncer de colo do útero	14
1.3 Biologia do HPV.....	15
1.3.1 Papilomavírus humano	15
2 PREVENÇÃO	18
2.1 Vacinas.....	18
3. RASTREIO	19
3.1 Rastreio Molecular	21
3.2 Alvos no genoma do HPV e testes moleculares.....	22
4 JUSTIFICATIVA.....	26
5 OBJETIVO.....	27
6 MATERIAL E METÓDOS	28
6.1 Amostras	28
6.2 <i>BD Onclarity HPV Assay™</i>	30
6.2.1 Extração	32
6.2.2 Amplificação	32
6.2.3 Detecção	34
6.3 <i>INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (FUJIREBIO)</i>	35
6.3.1 Extração	36
6.3.2 Amplificação	36
6.3.3 Detecção	37
6.4 PCR em tempo real para HPV 16 com alvo em E7	39
6.4.1 Extração	40
6.4.2 Amplificação	40
6.4.3 Detecção	41
7 RESULTADOS	43
8 DISCUSSÃO	51
9 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer Cervical

Com aproximadamente 530 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres (quadro 1), sendo responsável pelo óbito de 270 mil mulheres por ano. Da mesma forma, no Brasil, é o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colorretal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer¹.

Os dados mais recentes do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam 16.340 novos casos por ano (para o biênio 2016 e 2017). Estratificando por regiões, são 1.970 casos na região Norte, 5.630 na região Nordeste, 1.560 na região Centro-Oeste, 2.240 na região Sul e 4.940 na região Sudeste, com um risco aproximado de 16 casos a cada 100 mil mulheres no país². A análise da incidência regional do câncer do colo do útero no Brasil mostra a região Norte como a mais incidente, com 23,97 casos por 100.000 mulheres, as regiões Centro-Oeste e Nordeste, com taxas de 20,72/100 mil e 19,49/100 mil, respectivamente, ocupando a 3ª e 4ª posição fica a região Sudeste com 11,3/100 mil, e a Sul com 15,17/100 mil³.

Estimativas para o ano de 2016 de número de casos novos de câncer, por região.*					
Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Próstata	2.470	14.290	5.050	13.590	25.800
Mama Feminina	1.810	11.190	4.230	10.970	29.760
Colo do Útero	1.970	5.630	1.560	2.240	4.940

Quadro 1 - Estimativa de câncer no Brasil em 2016².

1.2 HPV e câncer de colo do útero

Os avanços das técnicas de biologia molecular possibilitaram a identificação do DNA do papilomavírus humano (HPV) em amostras de tecidos de carcinomas cervicais⁴. Estudos multicêntricos confirmaram a presença do DNA do papilomavírus em quase 100% dos carcinomas invasivos, levando à tese mundialmente aceita de que a infecção pelo HPV é "causa necessária para o desenvolvimento do carcinoma invasivo"^{5,6}. Atualmente, a relação causal entre a infecção por HPV e o câncer do colo do útero está bem estabelecida⁷.

Isso acontece devido a infecções persistentes pelo HPV de alto risco oncogênico, entre outros fatores de risco para o câncer cervical. Estudos para o rastreio do câncer do colo do útero têm demonstrado que o uso de técnicas de biologia molecular apresenta vantagens em relação ao Papanicolaou, pelo fato de identificar a presença do vírus⁷⁻¹¹.

De acordo com Lorincz *et al.*¹², os tipos individuais de HPV que infectam o colo do útero têm diferentes graus de associação oncogênica; HPV 6 e HPV 11 têm pouca associação oncogênica, e HPV 16 e HPV 18 têm maior associação oncogênica. Os autores também observaram que a frequência de detecção de HPV 16 aumenta com o grau da lesão intra-epitelial, sendo cerca de 20% no NIC 1 (neoplasia intra-epitelial cervical), 43% no NIC 2 e 50% no NIC 3. Os mesmos autores constataram que 47% dos casos de carcinoma escamoso continham HPV 16, o que sugere que o câncer cervical pode se desenvolver de forma gradual através de lesões intra-epiteliais. As infecções com HPV 6 ou HPV 11 resultam em uma lesão benigna que pode persistir ou regredir, mas raramente evoluir para câncer^{13,14}. É por esta razão, que certos tipos de HPV são considerados fatores de baixo risco, enquanto outros são considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer cervical. Mais estudos são necessários para elucidar o real grau de

oncogenicidade de cada tipo de HPV. De fato, alguns estudos sugerem que o HPV 6 e o HPV 11 são, raramente, associados com a iniciação de neoplasias malignas epiteliais^{8,15,16}. Outros trabalhos indicam que tumores contendo o HPV 16 têm um curso clínico mais agressivo e maior possibilidade de recorrência do que os tumores do colo do útero semelhantes com HPV 18¹⁷⁻²¹. Também foi relatado que as pacientes com HPV 16 ou HPV 18 tinham significativamente mais recorrências após tratamento do que as pacientes com HPV 6 ou HPV 11²². Todas estas observações tendem a demonstrar que os genótipos de HPV podem influenciar o resultado clínico e sugerir que genótipos de HPV poderiam ser um indicador de prognóstico em lesões do colo do útero¹⁷.

A classificação epidemiológica de genótipos de HPV coloca 15 tipos como de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73 e 82); três como prováveis tipos de alto risco (26,53 e 66) e 11 foram classificados como de baixo risco (6,11,40,42,43,44,54,61,70,81 e CP6108)²³.

1.3 Biologia do HPV

1.3.1 *Papilomavírus humano*

O Papilomavírus humano pertence à família *Papillomaviridae*, tem cerca de 8.000 pares de bases (pb) e formato icosaédrico. Seu ciclo de vida é diretamente ligado a diferenciação das células epiteliais do hospedeiro. O genoma do HPV (figura 1) é constituído por aproximadamente oito *open reading frames* (ORF), possuindo pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente de E (*Early*) e L (*Late*)^{24,25}.

A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Dentre estes, E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a

maturação viral e alteração da matriz intracelular e E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular^{24,26-28}.

A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), variando de 400 a 1000 pb, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação^{26,29}.

A principal diferença entre baixo e alto risco, a nível molecular, diz respeito à capacidade de E6 e E7 de se ligar e inativar os dois principais supressores tumorais, p53 e pRb. Os efeitos da E6 e E7 sobre p53 e pRb, entre outras proteínas hospedeiras, respondem por grande parte do potencial oncogênico dos genótipos de alto risco de HPV³⁰.

Figura 1 - Genoma do HPV (adaptado de Genta MLN.)³¹.

Uma vez que o vírus penetra na camada basal do epitélio, por microlesões, inicia-se a infecção (figura 2). Nessa localização não há replicação viral, o vírus apenas mantém seu genoma na forma epissomal, em baixa quantidade, aproximadamente 50 a 100 cópias por célula. A fase replicativa e a síntese proteica ocorrem nos queratinócitos diferenciados das camadas suprabasais. O DNA do HPV replica em células basais diferenciadas e progride para a superfície do epitélio. O tempo de evolução e o tipo de lesão se correlacionam com a quantidade de partículas virais detectadas^{26,32}.

Figura 2 - Infecção do epitélio pelo HPV³³.

Quando ocorre a infecção pelo HPV, o genoma viral pode aparecer de duas diferentes formas: HPV de alto risco oncogênico epissomal, HPV de alto risco oncogênico integrado, ou nas duas formas misturadas. Na forma epissomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, e essa forma é identificada em lesões benignas. Para que ocorra a integração do DNA do HPV ao genoma humano, é necessário o rompimento da região E1-E2, com desregulação do controle transcricional dos genes virais. Durante essa integração, muitas vezes a região L1 é perdida, enquanto a região E6/E7 sempre estará presente^{34,35}.

Apesar de esse ser o modelo mais comum, estudos mais recentes têm mostrado casos de câncer com DNA epissomal, infecções assintomáticas/NIC1 com integração, onde nem sempre o rompimento acontece nas regiões E1 e E2. O rompimento pode ocorrer em diferentes regiões do genoma, e inclusive acarretar a perda dos genes E6 e E7³⁶.

2 Prevenção

2.1 Vacinas

A vacinação é uma medida primária contra a infecção pelo HPV, responsável pelo câncer do colo uterino, e tem-se mostrado eficaz e segura. Ainda é cedo para constatar a eficácia da vacinação na incidência do câncer cervical, mas dados iniciais mostram que a vacinação contra o HPV tem sido efetiva na proteção contra a infecção persistente por HPV 16 e HPV 18 e na redução da incidência de verrugas genitais (devido à proteção contra HPV 6 e HPV 11), que a vacina quadrivalente fornece, em diversas populações³⁷.

A Austrália foi o primeiro país a implantar a vacina quadrivalente, em 2007, para meninas de 12 e 13 de idade, na escola. Em 2009, foram implantados mais 2 programas de rastreamento, um para meninas de 13 a 18 anos, na escola, e o outro para mulheres de 18 a 26 anos, na comunidade³⁸. Um estudo australiano publicado em 2013, mostrou uma redução significativa das lesões de alto grau na citologia e também naquelas confirmadas pela histologia³⁹.

No Brasil, a introdução da vacina quadrivalente para HPV no calendário vacinal, que protege contra os tipos de HPVs 6, 11, 16 e 18, ocorreu em 2014, para

meninas de 9 a 13 anos de idade. Em 2017, a vacinação foi estendida para meninas de 14 anos de idade e meninos de 11 a 14 anos de idade⁴⁰.

Um estudo retroativo, em 7 Registros Hospitalares de Câncer (RHC) dos Estados Unidos da América, aponta que os HPVs 16 ou 18 foram encontrados em 67% dos casos de carcinoma cervical invasivo. Assim, espera-se que a partir da introdução da vacina quadrivalente, que protege contra a infecção pelo HPV dos tipos oncogênicos HPV 16 e 18, e contra os tipos de HPV de baixo risco oncogênico HPV 6 e 11, em meninas a partir dos 9 anos de idade, o cenário do rastreamento mude. O que se espera, para o futuro do rastreio pela citologia, é que haverá uma dificuldade maior em rastrear lesões precursoras, devido a diminuição da incidência destas lesões. Ou seja, quando as meninas vacinadas hoje alcançarem a idade recomendada para o rastreamento, as lesões precursoras causadas pelos vírus 16 e 18, os mais frequentes, poderão ter quase desaparecido, tornando o achado citológico muito mais raro e de muito mais difícil diagnóstico, justamente por ser raro⁴¹.

3 Rastreio

Um estudo realizado em 2008 por Ronco *et al*¹¹; analisou a sensibilidade da citologia convencional e teste molecular para HPV, em dois grupos separados por idade, e concluiu que nas mulheres de 25-34 anos, o teste do HPV tem uma sensibilidade relativa maior, em comparação com a citologia. Nas mulheres com idade de 35-60 anos, o ganho na sensibilidade foi menor do que nas mulheres mais jovens¹¹.

Em 2010, Ronco *et al*⁴² concluíram que o rastreio com o teste para HPV é mais eficaz do que a citologia na prevenção do câncer do colo do útero invasivo, através da detecção prévia de lesões de alto grau persistentes, e proporciona um maior período de intervalo entre os rastreios. No entanto, em mulheres mais jovens,

abaixo dos 30 anos, o rastreio do HPV leva ao excesso de diagnóstico de NIC 2 regressivo⁴².

Hoje em dia, vários países fazem o rastreio primário utilizando o teste molecular, uma vez que ele tem se mostrado vantajoso em países tão diferentes quanto a África do Sul e a Holanda, entre outros^{43,44}.

Em março de 2012, a *U. S. Preventive Services Task Force (USPSTF)* recomendou o rastreio com Papanicolaou a cada 3 anos, para mulheres de 21 a 65 anos. Para as mulheres de 30 a 65 anos que querem aumentar o intervalo do rastreamento, triagem com uma combinação de citologia e teste de HPV a cada 5 anos⁴⁵. Cada país tem sua realidade de sistema de saúde, o que interfere na decisão de qual a melhor opção de rastreamento. Uma pesquisa realizada em 2012, em países da Europa, usando um modelo holandês de micro simulação, concluiu que o rastreio pelo teste de HPV é mais vantajoso financeiramente, na maioria dos diferentes cenários analisados, embora só deva ser implantado em cenários em que o rastreio esteja bem organizado⁴⁶.

Em 2014, a partir do estudo Athena, o FDA aprovou o *screening* cervical baseado no teste de DNA do HPV (*COBAS HPV TEST*), para mulheres acima de 25 anos. Neste protocolo, caso o resultado do teste seja HPV 16 e/ou HPV 18, a mulher é encaminhada para colposcopia⁴⁷.

Um estudo relevante realizado no Brasil, na cidade de São Paulo, em 2016, pôde mostrar a alta sensibilidade para detecção de lesões pré-malignas pelo teste molecular para HPV de alto risco oncogênico, que não foram detectadas pela citologia em meio líquido⁸.

De acordo com Tjalma WAA e Depuydt CE³⁴, “O futuro do rastreio do câncer cervical será baseado no teste de HPV”. Porém, existem dúvidas de qual teste usar,

devido à diferença existente entre as plataformas para realização dos ensaios, *iniciadores*, tipo de extração e de leitura dos resultados.

Em um amplo estudo feito nos EUA, pôde-se concluir a eficácia do rastreamento primário com teste para DNA do HPV COBAS (Roche™), mostrando que para mulheres com 25 anos ou mais, a detecção de NIC 3+ é equivalente ao resultado obtido com os dois testes em paralelo. Mas, o rastreamento, quando realizado dessa maneira, apesar de permitir aumentar o intervalo entre exames, aumenta o número de encaminhamentos para colposcopia⁹.

3.1 Rastreio Molecular

Métodos moleculares mais avançados e diversos estudos sobre a história natural da doença resultaram em novas tecnologias para o rastreio do material genético do HPV, especificamente dos tipos oncogênicos, que são os agentes causais do câncer cervical. A maior sensibilidade dos testes moleculares em relação ao Papanicolaou já é amplamente conhecida, além disso, essas técnicas automatizadas são compatíveis com grandes rotinas, como o rastreio populacional do câncer cervical^{10,48}.

Para entender melhor a carcinogênese do vírus, e para avaliar melhor as condutas no rastreamento do câncer cervical, é muito importante detectar e genotipar os HPVs de alto risco oncogênico presentes nos carcinomas⁴⁸.

A partir da introdução do ensaio *high-risk HPV Hybrid Capture 2* (HC2), um teste validado clinicamente pela *Food and Drug Administration* (FDA), capaz de detectar o genoma todo do vírus, a maioria dos ensaios de identificação do DNA do HPV começaram a ser desenvolvidos usando *polymerase chain reaction* (PCR) com conjuntos de *iniciadores* consenso, da região L1 do genoma do vírus⁴⁹. Os

métodos de detecção de HPV variam em vários aspectos, existem ensaios de PCR em tempo real, PCR convencional, hibridização e sequenciamento⁵⁰.

3.2 Alvos no genoma do HPV e testes moleculares

Os tipos de ensaios de *PCR* para detecção de HPV incluem iniciadores consenso da região conservada em L1, sendo eles (MY9/11, SPF10, GP5+/6+) e o (PGMY9/11) desenvolvido posteriormente, tido como uma versão mais curta do MY9/11. Esses iniciadores consenso da região L1 amplificam fragmentos de DNA de tamanhos diferentes (de 65 pb com SPF10 até 455 pb com MY9/11). Há ainda ensaios que têm como alvo outras regiões do genoma do vírus, tais como E1, E2, E6 e E7^{34,51}.

Table 1. Human papillomavirus (HPV)-based tests*

Marker	Test name	Manufacturer	Target molecule	Regulatory approval(s)	Target HPV genotypes	HPV genotyping	Technology
HPV DNA	Amplicor careHPV	Roche	L1	CE	13 carcinogenic	No	PCR
	Cervista	Qiagen	Full genome	CE	13 carcinogenic and HPV66	No	Hybridization
	CLART	Hologic Genomica	L1	FDA/CE	13 carcinogenic and HPV66	Partial (HPV16 and HPV18)	Hybridization
			L1	CE	13 carcinogenic and 22 noncarcinogenic	Yes	PCR
	COBAS 4800 eHC	Roche	L1	CE	13 carcinogenic and HPV66	Partial (HPV16 and HPV18)	Real-time PCR
		Qiagen	Full genome	n/a	13 carcinogenic, HPV66, and HPV82	Partial (HPV types 16, 18, and 45)	Hybridization
	GP5+/6+ EIA HC2	Not Commercialized	L1	n/a	13 carcinogenic and HPV66	No	PCR
	HPV QUAD	Qiagen Autogenomics	Full genome E1	FDA/CE/sFDA	13 carcinogenic†	No	Hybridization
	HR-HPV Dx PCR Infinity HPV	BioRad Autogenomics	n/a	CE	13 carcinogenic and HPV66	Partial (HPV types 16, 18, 31, 33, and 45)	PCR
	InnoLiPA	Innogenetics	L1	CE	13 carcinogenic and 13 noncarcinogenic	Yes	PCR
	Linear Array	Roche	L1	CE	13 carcinogenic and 15 noncarcinogenic	Yes	PCR
	Multiplex HPV Genotyping Kit Papillocheck	Multimetrix Greiner	L1	n/a	13 carcinogenic and 24 noncarcinogenic	Yes	PCR
HPV RNA	RT HPV n/a	Abbott Becton Dickinson	L1	CE	13 carcinogenic and HPV66	Partial (HPV16 and HPV18)	Real-time PCR
	Aptima NucliSENS EasyQ HPV	GenProbe BioMerieux	E6/E7 mRNA	CE	13 carcinogenic and HPV66	Partial (HPV types 16, 18, 31, 45, 51, 52, and 59)	Real-time PCR
	OncoTect	Invision/InCellDx	E6/E7 mRNA	CE	HPV types 16, 18, 31, 33, and 45	No	TMA
				CE	13 carcinogenic	Yes	NASBA
HPV protein	PreTect Proofer E6 protein cytoactiv	Norchip Arbor Vitae	E6/E7 mRNA	CE	HPV types 16, 18, 31, 33, and 45	n/a	In situ hybridization
	CINtec plus ProExC	mtm Laboratories Becton Dickinson	p16 ^{INK4a} /Ki67	n/a	HPV types 16, 18, and 45	Yes	NASBA
Cellular protein FISH			L1	CE	Carcinogenic types, not specified	n/a	Immunostain
			MCM2/Top2A	CE	n/a	n/a	Immunostain
	oncoFISH	ikonisys	3q/TERC	IVD Class I	n/a	n/a	Immunostain
				CE	n/a	n/a	FISH

* CE = Conformité Européenne (European conformity); FDA = Food and Drug Administration; FISH = fluorescence in situ hybridization; IVD = in vitro device; n/a = not available; NASBA = nucleic acid sequence-based amplification; PCR = polymerase chain reaction; sFDA = State Food and Drug Administration (China); TMA = transcription-mediated amplification.

† Cross-hybridization with noncarcinogenic HPV types described.

Quadro 2 - Testes comercialmente disponíveis em 2012⁵².

O quadro 2, do estudo de Poljak *et al*⁵² (2015), mostra testes moleculares para HPV disponíveis no mercado. Existem mais de 190 testes, o que representa um aumento de 54% desde 2012. A maioria tem como alvo o gene L1 do vírus⁵².

Em um estudo realizado em 2011, com o intuito de saber se existe câncer cervical HPV negativo, usando como testes *PapilloCheck®*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 350 pb com alvo na região E1 do HPV, e *Linear Array HPV Genotyping*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 450 pb com alvo na região L1, entre outros testes tentando identificar o genoma todo do HPV, pôde-se obter 99% dos tumores cervicais positivos para HPV. O trabalho sugere que os casos de câncer cervical negativo para HPV podem ser devidos à metástase de tumores extra cervicais, e que não tem relação com HPV, e/ou falha nos testes⁵⁰.

Em um estudo publicado em 2013 para validação clínica do *BD Onclarity HPV Assay™* (Becton, Dickinson and Company, EUA), este teste foi comparado com a técnica já validada *Hybrid Capture 2 (HC2, QIAGEN)*, e mostrou que a sensibilidade e a especificidade foram equivalentes em mulheres acima de 30 anos com NIC2+⁴⁹.

Em outro estudo realizado com 10.575 casos de câncer cervicais invasivos diagnosticados em 38 países da Europa, um número substancial de amostras foi negativo para DNA do HPV, dentre as quais, 38% dos casos de adenocarcinoma e 13% dos casos de carcinomas escamocelulares. Nesse estudo, a genotipagem foi feita com *iniciadores* SPF-10 da região L1. Dos casos negativos, foram analisadas 200 amostras escolhidas aleatoriamente, 60% destas amostras foram negativas para beta globina e beta actina, de onde os autores concluem que a negatividade para DNA de HPV dessas amostras pode ser atribuída a problemas técnicos de

fixação, armazenamento, sobretudo levando-se em consideração o fato das amostras serem provenientes de muitos laboratórios diferentes⁵³.

A maioria dos testes, como o COBAS 4800 (ROCHE) e o INNO-LIPA (INNOGENETICS), tem como alvo, conjuntos de *iniciadores* da região L1 do DNA, por ser uma região mais conservada. Outros testes usam como alvo o RNA mensageiro (mRNA) E6/E7, esses testes são mais específicos, já que são proteínas expressas pelos oncogenes virais E6/E7, relacionadas com a atividade oncogênica, que provavelmente progredirão para câncer. Porém, há uma grande dificuldade em trabalhar com RNA, devido à fácil degradação dessa molécula^{48,52,54}.

4 JUSTIFICATIVA

São necessários mais estudos para esclarecer as causas de alguns carcinomas cervicais invasivos terem resultado negativo para HPV. Uma vez que se espera que 100% desses tumores sejam positivos para HPV, é necessário avaliar as causas destes falsos negativos, e com isso reduzir falhas no rastreamento do câncer cervical.

5 OBJETIVO

Comparar dois métodos de detecção e genotipagem de HPV em amostras de tumores cervicais, a fim de esclarecer qual o melhor alvo, L1 ou E6/E7.

6 MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 84 amostras de tumores cervicais fixadas com formol e embebidas em parafina para detecção e genotipagem de HPV, utilizando-se dois métodos moleculares, *BD Onclarity HPV Assay*[™] e INNO-LiPA. Um terceiro método, PCR em tempo real para HPV 16 com alvo em E7, foi usado ao final, para retestar 7 amostras.

6.1 Amostras

As amostras avaliadas foram obtidas do setor de Anatomia Patológica do ICESP/HCFMUSP, tendo sido objeto de estudo anterior da Tese de Doutorado: “Genotipagem do Papilomavírus Humano (HPV) nos casos de câncer de colo uterino do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) no período de 2008 a 2012”³¹.

Como a plataforma *BD Onclarity HPV Assay*[™] não prevê o teste de material fixado com formol e embebido em parafina, para a genotipagem destas amostras, foi necessário realizar algumas etapas pré-analíticas, manualmente:

- realização de 3 cortes histológicos, com espessura de 10µm, depositados em um microtubo;
- Identificação com etiquetas dos tubos *BD Onclarity*[™] HPV LBC em que foram colocadas as amostras;
- passagem dos 3 cortes do microtubo para o tubo *BD Onclarity*[™] HPV LBC;
- adição de 0,5 ml de água destilada;

- inversão do tubo com o material parafinado dentro, 3-4 vezes para garantir a mistura do material com o diluente.

A seguir, os tubos foram colocados na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™* para detecção e genotipagem.

Esse procedimento foi realizado com 446 amostras, das quais foram excluídas 32 por falha do método, devido aos erros apontados pelo aparelho, tal como conteúdo insuficiente (*ET*) ou ausência de controle interno (*IC*) no fragmento analisado.

Neste trabalho, 414 amostras de pacientes diagnosticadas com tumor primário e invasivo de colo uterino, previamente confirmadas, foram genotipadas na plataforma *BD Onclarity HPV Assay* (sistema Viper). Destas, as 57 que foram negativas para todos os tipos de HPV de alto risco compõe as amostras aqui estudadas.

Para este estudo, foi usado o restante do DNA já extraído destas 57 amostras negativas. Além destas, selecionamos outras 27 amostras do mesmo estudo anterior com resultado positivo na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™*, ou seja, testamos uma amostra positiva para cada 2 negativas. Como critério para seleção das 27 amostras, além do resultado positivo para HPV na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™*, as amostras tinham o diagnóstico histológico de carcinoma escamocelular ou adenocarcinoma. Para selecionar estas 27 amostras, localizamos os ensaios do qual faziam parte as 57 amostras negativas. Dentro de cada um desses ensaios, organizados em ordem cronológica, foi escolhido o primeiro caso com resultado positivo na sequência de um negativo. Este processo foi repetido a cada duas amostras negativas.

Dos 57 casos considerados negativos para HPV neste estudo, 41 amostras tiveram resultado negativo para todos os tipos de HPV de alto risco e 16 tiveram resultado *IC*, ou seja, ausência de controle interno no relatório emitido pelo Viper. Os dados brutos destas amostras tidas como *IC*, foram extraídas do sistema Viper através de um pen drive e enviadas para a *BD* dos Estados Unidos da América, para serem analisadas. Essa análise mostrou que apesar do resultado *IC*, as amostras eram positivas para beta globina (gene humano) e negativas para todos os tipos de HPV. Isso aconteceu pelo fato do equipamento ter sido parametrizado para uso com citologia líquida, e não para material fixado em formol e embebido em parafina. Dessa maneira, o DNA existente na amostra não alcançava o limiar de fluorescência pré-estabelecido, após os ciclos de PCR.

As 84 amostras selecionadas foram testadas no sistema *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra*.

6.2 BD Onclarity HPV Assay™

Atualmente, o único teste de DNA com alvo em E6/E7 é o *BD Onclarity HPV Assay™*. Esse ensaio é baseado na amplificação e detecção simultânea do DNA alvo por meio de *iniciadores* de amplificação e sondas de detecção marcadas com fluorescência usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O *Onclarity HPV Assay™* detecta simultaneamente 14 genótipos de HPV de alto risco, a partir dos genes E6 e E7 do DNA do vírus, tendo capacidade para amplificar um fragmento de DNA viral de 79-137 pares de bases. Esta metodologia fornece a genotipagem individual de seis HPVs (HPV 16, 18, 31, 45, 51 e 52), e de

três grupos genotípicos compostos por oito HPVs (P1: HPV 33-58; P2: HPV 56-59-66; e P3: HPV 35-39-68)⁴⁹.

A primeira etapa aconteceu no aquecedor BD *Pre Warm* (figura 3) para homogeneizar a matriz, lisar células e liberar o DNA. A próxima etapa, que envolve a extração do DNA alvo e a amplificação, aconteceu no *Viper LT*, plataforma totalmente automatizada (figura 6).

Figura 3 - Aquecedor BD *Pre Warm*.

6.2.1 Extração

O processo tem início pela transferência da amostra para um tubo de extração que contém partículas de óxido férrico em um filme solúvel. É adicionado ácido para reduzir o pH e induzir uma carga positiva no óxido férrico, que por sua vez, se liga ao DNA, uma molécula negativamente carregada. As partículas e o DNA ligados são então atraídos para as laterais do tubo de extração por ímãs e a amostra tratada é aspirada como resíduo. Após a lavagem das partículas, um tampão de eluição com alto pH é adicionado para eluir o DNA purificado, e um tampão de neutralização é usado para ajustar o pH do eluato, para um pH ótimo para amplificação do DNA.

6.2.2 Amplificação

Os reagentes necessários as reações apresentam-se liofilizados em três diferentes tubos G1 (azul), G2 (verde) e G3 (laranja). Cada tubo contém os *iniciadores* de amplificação, sondas de detecção marcadas com fluorescência, DNA polimerase, nucleotídeos e outros reagentes necessários para amplificação, além de um controle interno, um fragmento de DNA proveniente do gene da beta globina humana, como mostra a figura 4.

Cada amostra é transferida para cada um dos 3 tubos de PCR. O tubo identificado como G1 contém sondas e iniciadores para amplificação dos genótipos de forma individual 16, 18 e 45, o G2 amplifica os genótipos 31 individualmente e agrupados (33 e 58) e (56, 59 e 66) e o G3 amplifica os genótipos de forma individual 51 e 52 e de forma agrupada (35, 39 e 68).

Cada placa é montada para, no máximo, 30 amostras e dois controles. Em seguida, a placa é tampada com um selante transparente, a fim de prevenir contaminação. (figura 5)

Figura 4 - Tubos para PCR na plataforma *BD Onclarity HPV Assay*, e os genótipos que cada um identifica.

Figura 5 - Placa de PCR montada para 30 amostras e 2 controles.

6.2.3 Detecção

O resultado é definido pela presença ou ausência de DNA de HPV, que é determinada pelo ciclo de PCR no qual o sinal cruza um limiar pré estabelecido. O equipamento imprime uma listagem ao final do ciclo com os resultados.

Figura 6 - Equipamento *Viper LT*TM da BD usado com a plataforma *BD Onclarity HPV assay*TM para detecção e genotipagem de HPVs de alto risco oncogênico.

6.3 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (FUJIREBIO)

É um teste molecular que se baseia no princípio da hibridização reversa, identifica 28 genótipos diferentes de HPV com alvo para sequências específicas na região L1 do genoma do HPV, tamanho do amplicon de 65 pares de base. O ensaio utiliza os iniciadores SPF10 para amplificação do HPV⁵⁰.

O ensaio com INNO-LiPA, diferentemente da plataforma *BD Onclarity*, é totalmente manipulado por técnico de laboratório, que deve manter a limpeza cuidadosa do fluxo laminar, para evitar a contaminação da estação de trabalho, dos equipamento e materiais utilizados e também das amostras. Esse procedimento inclui o uso de hipoclorito 0,1%, etanol 70% e 15 minutos de exposição à luz Ultravioleta.

6.3.1 Extração

Foi usado o DNA extraído na plataforma *BD Onclarity HPV Assay*™, como descrito no item extração, do ensaio com *Onclarity*.

6.3.2 Amplificação

Foi utilizado o Kit para amplificação *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Amp* - 81064 (FUJIREBIO). Dentro de uma cabine de fluxo laminar, é feito o preparo da reação de PCR. Em um microtubo de 1,5 ml foram adicionados 37,7 microlitros (µL) de AMP MIX e 2,3 microlitros (µL) de ENZ MIX, após centrifugação e homogeneização, foram distribuídos 40 µL em microtubos de 200 µL. A seguir, foram acrescentados 10 µL de DNA de cada amostra. Foram incluídos também um tubo para controle negativo (água deionizada livre de DNA/DNase) e um tubo para controle positivo (0,5pg plasmídeo HPV16 + 1ng HeLa/ (HPV18) + 5 µ (HPV6/ HLA-DPB1).

Em seguida, todos os tubos foram transferidos para o termociclador, programado com os tempos e temperaturas ideais padronizados pelo fabricante.

6.3.3 Detecção

Para esta etapa, foram usadas tiras de nylon (figura 8) onde ocorrem a reação de hibridização e a lavagem estrigente. Para tanto, foram utilizados tampões mantidos em banho-maria a 49°C, podendo variar no máximo 0,5°C. A temperatura é conferida com termômetro até o fim da reação. Os demais reagentes utilizados foram mantidos em temperatura ambiente.

Com o auxílio de uma pinça, cada tira foi identificada a lápis, e com essa marcação voltada para cima, depositada em uma bandeja. Em seguida, adicionou-se no canto de cada canaleta da bandeja, contendo a tira identificada, 10 µL da solução de denaturação por 5 minutos, homogeneizando com a pipeta e cuidadosamente adicionando 10 µL do produto amplificado.

Após estas etapas, a bandeja foi colocada dentro do Autoblott-3000 (FUJIREBIO, Europa) (figura 7), e programados os passos para hibridização. O equipamento suporta 20 tiras em cada reação, que dura 3 horas.

Figura 7 - Hibridizador Autoblott-3000 (FUJIREBIO, Europa)

Após esta etapa, as tiras foram retiradas e colocadas sobre papel absorvente por cerca de 12 horas, para secagem (figura 8).

A leitura dos resultados foi realizada de acordo com a intensidade do precipitado (roxo/marrom) nas tiras, usando-se o cartão de leitura para obter o resultado a partir da comparação com o gráfico de interpretação (figura 9).

Figura 8 - Tiras de nylon para identificação dos genótipos no ensaio com INNO-LiPA.

Probe #	HPV genotypes																																		
	9 LR	11 LR	16 HR	18 HR	18 HR	26* pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	45 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71**	70 LR	70 LR	73 HR	74**	82 HR	
1	X																																		
2		X																																	
3			X																																
4				X																															
5					X																														
6						X																													
7																																			
8							X				X													X	X				X						
9							X	X												X															
10						(X)***	X																												
11									X																										
12				X	X					X																		X					X		
13											X																								
14												X																							
15													X																						
16														X	X																				
17																X																			
18							X	X			X						X		X			X	X	X	X										
19																		X	X																
20																					X													X	
21																					X														
22																						X	X	X	X										
23																										X									
24																												X							
25															X														X			X	X		
26																														X	X				
27																																X			
28																																			X

*: 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 **: 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 ***: probeline 10 may show weak reactivity when probelines 8 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31

Figura 9 - Gráfico usado para interpretação dos resultados do ensaio com INNO-LiPA.

6.4 PCR em tempo real para HPV 16 com alvo em E7

O terceiro ensaio realizado foi PCR em tempo real específico, com alvo na região E7 do HPV 16. O conjunto de iniciadores (figura 10) usado neste ensaio foi descrito por Wallboomers *et al.*⁶ e é capaz de amplificar um fragmento de até 100 pb.

Primer	Sequence (5'–3')
HPV16E7.667	gatgaaatagatggtccagc
HPV16E7.774	gctttgtacgcacaaccgaagc

Figura 10 - Iniciadores usados para amplificação do HPV 16. Adaptado de Wallboomers *et al.*⁶

A sonda utilizada nessa reação foi padronizada no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para uma tese de doutorado. A sonda 5' TTTAAGGAGTACCTACGACATG 3' foi marcada com FAM (6-Carboxifluoresceína)

como *reporter* na porção terminal 5' e com MGB (Minor Groove Binder) na porção 3' da sonda⁵⁰.

6.4.1 Extração

Foi usado o DNA extraído na plataforma *BD Onclarity HPV Assay*™, como descrito no item extração, do ensaio com *Onclarity*.

6.4.2 Amplificação

O ensaio foi feito com cada amostra em duplicata, utilizando o kit Taqman PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Inc.*, EUA). Dentro de um fluxo laminar é feita a mistura para a PCR. Em micro-tubo de 100 µL, foram adicionados 12,5 µL do Master Mix (DNA polimerase, tampão, nucleotídeos), 1 µL (400nM) de iniciadores HPV 16-E7 senso e 1 µL (400nM) de iniciadores HPV 16-E7 anti-senso, 0,5 µL (200 nM) de sonda específica para HPV 16. Após homogeneização da mistura, foram adicionados cuidadosamente, para não formar bolhas, 5 µL (250 ng) de DNA da amostra e água livre de DNase/RNase (*Life Technologies, USA*) até um volume final de 25 µL, sendo distribuídos 12,5 µL para cada micro tubo.

Como controle positivo foram usadas células da linhagem Caski e HeLa, e como controle negativo foi usada água.

Após ser feita essa mistura, cada amostra foi pipetada em sua posição na placa de PCR, para ser acondicionada no termociclador Quantstudio™ 5 System (*Applied Biosystems, Inc.*, EUA) (figura 11). Foram realizados ciclos com diferentes temperaturas para amplificação, 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos (95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto).

Figura 11 - Termociclador Quantstudio™ 5 System (*Applied Biosystems, Inc.*, EUA)

6.4.3 Detecção

O resultado da PCR em tempo real é interpretado a partir de um gráfico, onde cada linha representa uma amostra e seu crescimento exponencial, de acordo com a amplificação ocorrida em cada ciclo de temperatura (figura 12). Quando a linha atinge um limiar pré-estabelecido (*cT* - *Cycle Threshold*), pode-se ver a expressão do gene alvo, se ele estiver presente. O limiar (*Cycle Threshold*) é definido pelo equipamento com base nas leituras dos primeiros ciclos, o que equivale ao *background*^{50,55}.

Na figura 12 podemos ver a representação gráfica da PCR em tempo real, onde *Rn* é o sinal fluorescente do *reporter* dividido pela fluorescência de uma referência passiva. No eixo horizontal, temos o número de ciclos de temperatura realizados^{50,55}.

Figura 12 - Gráfico da amplificação das amostras após os ciclos de temperatura.

7 RESULTADOS

No presente estudo foram analisadas 84 amostras de tumores cervicais, sendo 57 negativas e 27 positivas na plataforma *BD Onclarity HPV Assay*™.

Dentre as negativas, 4 (7%) provinham de pacientes com menos de 30 anos de idade, 39 (68,4%) de mulheres entre 30 e 64 anos e 14 (24,6%) com 65 anos ou mais.

Em relação às positivas, 3 (11,1%) eram de pacientes com menos do que 30 anos, 21 (77,8%) entre 30 e 64 anos e 3 (11,1%) com 65 anos ou mais.

Tabela 1 - Distribuição das amostras E6/E7 negativas por faixa etária das pacientes e tipo histológico do tumor.

FX ETARIA	ADC	CEC	OUTROS	TOTAL
A) Até 29	1 25%	3 75%	-	4 7%
B) 30 a 64	14 35.9%	22 56.4%	3 7.7%	39 68.4%
C) 65 e +	5 35.7%	9 64.3%	-	14 24.6%
TOTAL	20 35.1%	34 59.6%	3 5.3%	57

Das 57 amostras E6/E7 negativas (Tabela 1), observou-se que 39 (68,4%) tumores acometeram mulheres de 30 a 64 anos, sendo 14 (35,9%) adenocarcinomas, 22 (56,4) carcinomas escamocelulares, e 3 (7,7%) outros tipos de tumores cervicais (1 adenoescamoso, 1 adenosarcoma de baixo grau e 1 carcinoma indiferenciado).

Tabela 2 - Distribuição das amostras E6/E7 positivas por faixa etária das pacientes e tipo histológico do tumor.

FX ETÁRIA	ADC	CEC	Total
Até 29	2 66,7%	1 33,3%	3 11,1%
De 30 a 64	15 71,4%	6 28,6%	21 77,8%
65 e +	1 33,3%	2 66,7%	3 11,1%
Total	18 66,7%	9 33,3%	27

Em relação às amostras E6/E7 positivas, a tabela 2 mostra que a grande maioria dos tumores também acometeu mulheres na faixa etária dos 30 aos 64 anos. Nesta faixa etária, dos 21 tumores cervicais, 15 (71,4%) são adenocarcinomas e 6 (28,6%) carcinomas escamocelulares.

Tabela 3 - Resultados do ensaio com E6/E7 agrupados em relação ao tipo histológico do tumor.

Histologia	E6/E7			Total
	Falha de IC	Negativas	Positivas	
ADC	5 13,2%	15 39,5%	18 47,4%	38 45,2%
CEC	11 25,6%	23 53,5%	9 20,9%	43 51,2%
Outros	-	3 100%	-	3 3,6%
Total	16 19%	41 48,8%	27 32,1%	84

A tabela 3 mostra os tipos histológicos dos tumores nas amostras do estudo, em relação aos resultados no ensaio com E6/E7, sendo 38 (45,2%) adenocarcinomas, 43 (51,2%) carcinomas escamocelulares e 3 (3,6%) outros tipos de tumores (1 adenoescamoso, 1 adenosarcoma de baixo grau e 1 carcinoma indiferenciado).

Das 16 (19%) amostras com resultado de falha de *IC* no teste com E6/E7, 5 são adenocarcinomas e 11 são carcinomas escamocelulares.

Dentre as 41 (48,8%) negativas, 15 são adenocarcinomas, 23 são carcinomas escamocelulares e 3 outros tipos histológicos.

Das 27 (32,1%) positivas, 18 são adenocarcinomas e 9 carcinomas escamocelulares.

Tabela 4 - Resultados do teste com L1 agrupados em relação ao tipo histológico do tumor.

Histologia	<u>L1</u>			Total
	Inadequadas	Negativas	Positivas	
ADC	7 18,4%	12 31,6%	19 50%	38 45,2%
CEC	19 44,2%	13 30,2%	11 25,6%	43 51,2%
Outros	1 33,3%	2 66,7%	-	3 3,6%
Total	27 32,1%	27 32,1%	30 35,7%	84

A tabela 4 mostra a relação entre o tipo histológico dos tumores e os resultados do ensaio com L1, 27 (32,1%) amostras tiveram resultado inadequado para amplificação na reação de PCR, provavelmente devido à quantidade insuficiente de DNA presente na amostra ou má qualidade do material. Destas, 7 são adenocarcinomas, 19 carcinomas escamocelulares e 1 adenoescamoso.

Dentre as 27 (32,1%) negativas, 12 são adenocarcinomas, 13 carcinomas escamocelulares e 2 de outro tipo histológico (1 adenosarcoma de baixo grau e 1 carcinoma indiferenciado).

Das 30 (35,7%) positivas, 19 são adenocarcinomas e 11 carcinomas escamocelulares.

Tabela 5 - Distribuição das amostras, considerando os resultados positivos agrupados, com os testes L1 e E6/E7.

<u>L1</u>	<u>E6/E7</u>			
	IC	Negativas	Positivas	Total
Inadequadas	15 55,6%	12 44,4%	-	27 32,1%
Negativas	-	26 96,3%	1 3,7%	27 32,1%
Positivas	1 3,3%	3 7,3%	26 86,7%	30 35,7%
Total	16 19%	41 48,8%	27 32,1%	84

A tabela 5 mostra os resultados obtidos nos dois testes para todas as amostras sendo todos os positivos agrupados. Das 16 (19%) amostras *IC* no ensaio com E6/E7, 15 foram inadequadas no ensaio com L1, das 41 (48,8%) amostras negativas com E6/E7, 26 foram negativas com L1 e das 27 (32,1%) positivas com E6/E7, 26 foram positivas no ensaio com L1.

Para verificar a concordância entre os testes foi usado o cálculo de Kappa, resultando em 70, ou seja, uma boa concordância.

Na tabela 6, podemos ver a concordância excelente (Kappa=92,8), quando analisamos as amostras válidas, ou seja, somente aquelas que puderam ser efetivamente testadas.

Tabela 6 - Distribuição das amostras, considerando os resultados positivos agrupados, com os testes L1 e E6/E7 (exclui amostras não válidas).

<u>L1</u>	<u>E6/E7</u>		
	Negativas	Positivas	Total
Negativas	26	1	27
Positivas	3	26	29
Total	29	27	56

Tabela 7 - Distribuição das amostras por resultado específico com os testes para L1 e E6/E7.

<u>L1</u>	<u>E6/E7</u>							Total
	Negativas	IC	16	18	33 e 58	35, 39 e 68	45	
Negativas*	26	-	1	-	-	-	-	27
Inadequadas	12	15	-	-	-	-	-	27
16	1	1	19	-	-	-	-	21
18	-	-	-	1	-	-	-	1
33	-	-	-	-	1	-	-	1
35	-	-	-	-	-	1	-	1
39	-	-	-	-	-	1	-	1
52	1	-	-	-	-	-	-	1
82	1	-	-	-	-	-	-	1
16 e 58	-	-	1	-	-	-	-	1
16 e 18	-	-	-	1	-	-	-	1
16, 18, 68 e 83	-	-	-	-	-	-	1	1
Total	41	16	21	2	1	2	1	84

* Tendo em vista o propósito desta análise, as 2 amostras positivas para HPV 6 e HPV 11 foram agrupadas com as demais negativas para HPV de alto risco oncogênico.

Em relação aos genótipos encontrados (tabela 7) na plataforma *BD Onclarity*, para os 27 casos cujo resultado foi positivo, 21 aparecem como HPV 16, 2 como HPV 18, 1 HPV 45, um com genótipo P1 (33 e/ou 58) e 2 com P3 (35 e/ou 39 e/ou 68).

Comparando os dois métodos, das 57 amostras E6/E7 negativas, 26 também foram negativas para HPV de alto risco oncogênico quando testadas pelo método usando como alvo L1. Das 16 que foram inadequadas (IC) para amplificação com E6/E7, 15 foram também inadequadas no ensaio com L1.

Dentre as 57 negativas com E6/E7, 2 foram positivas para HPV 16, 1 foi positiva para HPV 52 e 1 para HPV 82 no ensaio com L1.

Das 27 amostras E6/E7 positivas, usadas como controle, 1 foi negativa na genotipagem por L1, 19 foram positivas para HPV 16, 1 foi positiva para HPV 18, 1 para HPV 33, 1 para HPV 35 e 1 para HPV 39. Foram observados 3 casos com genótipos múltiplos: (16 e 18), (16 e 58) e (16,18,68 e 83).

É importante ressaltar que nas amostras E6/E7 negativas do presente estudo, também se pôde identificar, no ensaio com L1, um evento raro, 2 casos de carcinomas escamocelulares (CEC) positivos apenas para HPVs de baixo risco, sendo 1 HPV 6 e 1 HPV 11. Esta identificação foi possível, pois o ensaio com INNO-LiPA detecta e genotipa alguns HPVs de baixo risco.

Tabela 8 - Distribuição dos resultados com L1 das amostras E6/E7 negativas por tipo histológico do tumor.

<u>L1</u>	<u>Histologia</u>			<u>Total</u>
	<u>ADC</u>	<u>CEC</u>	<u>Outros</u>	
Negativo	12 46,2%	12 46,2%	2 7,7%	26 45,6%
Inadequado	7 25,9%	19 70,4%	1 3,7%	27 47,4%
16	1 50%	1 50%	-	2 3,5%
52	-	1 100%	-	1 1,8%
82	-	1 100%	-	1 1,8%
Total	20 35,1%	34 59,6%	3 5,3%	57

Na tabela 8 podemos observar que, dos 4 casos positivos no ensaio com L1 que foram negativos com E6/E7, 3 são carcinomas escamocelulares e 1 adenocarcinoma.

Tabela 9 - Distribuição dos resultados nos ensaios com L1 e E6/E7, considerando HPV 16/18 e demais positivos agrupados.

L1	E6/E7				
	16/18	Outros gen.	IC	Negativas	Total
16/18	22	1	1	1	25
Outros gen.	-	3	-	2	5
Inadequadas	-	-	15	12	27
Negativas	1	-	-	26	27
Total	23	4	16	41	84

Na tabela 9 tem-se uma visão geral dos resultados dos 2 testes, agrupados por HPVs 16 e 18, por serem os genótipos mais importantes na etiologia do câncer cervical. Os demais grupos são formados pelos genótipos restantes agrupados, amostras inadequadas e amostras negativas.

A partir desse resultado, optamos por retestar 7 amostras, sendo as três HPV16 com resultados discordantes e outras 4 amostras com resultado HPV 16 nos 2 ensaios como controle, em um terceiro método de PCR, cujo alvo é o gene E7, como forma de tentar esclarecer a discordância. Os resultados obtidos são mostrados no quadro 3.

AMOSTRAS	TESTES		
	ONCLARITY E6/E7	INNO-LiPA L1	E7 PCR-RT
Discordantes	Negativa	Positiva	Negativa
Discordantes	Negativa	Positiva	Negativa
Discordantes	29,49	Negativa	35,73/36,19
Concordantes	20,68	Positiva	30,22 / 28,97
Concordantes	28,87	Positiva	33,26 / 34,06
Concordantes	34,11	Positiva	Negativa
Concordantes	31,77	Positiva	37,45 / 36,82

Quadro 3 - Comparação entre os resultados e valores de cTs dos testes para HPV 16.

Após a realização do ensaio específico para HPV 16 com alvo em E7, pudemos observar que, para as duas primeiras amostras discordantes, os resultados foram os mesmos do teste com E6/E7. Em relação à terceira amostra discordante, que foi positiva para o ensaio com E6/E7, também foi positiva no terceiro teste.

Em relação às amostras de controle, positivas nos dois ensaios, 3 foram positivas no ensaio com E7 e uma foi negativa.

Esses cTs mais baixos do *Onclarity*, sugerem uma maior sensibilidade em relação ao ensaio de PCR em tempo real com alvo em E7. Podemos ver que uma das amostras de controle, positiva nos dois primeiros ensaios e negativa no ensaio com E7, só alcançou o limiar pré-estabelecido no ensaio com E6/E7 com mais de 34 ciclos, demonstrando uma baixa quantidade de DNA, que não deve ter sido suficiente para ser detectada no ensaio com E7.

8 DISCUSSÃO

As amostras deste estudo são provenientes do único estudo realizado no Brasil, de detecção e genotipagem de HPV em tumores cervicais invasivos, preservados em parafina, usando a plataforma *BD Onclarity HPV assay*TM.

Estudos como este visam diminuir o peso desta doença na população feminina mundial, tendo em vista os dados da Organização Mundial de Saúde, que mostram a incidência de cerca de 530 mil casos de câncer de colo do útero no mundo, sendo 16.000 destes casos no Brasil. No mundo, o câncer de colo do útero leva cerca de 270 mil mulheres a óbito por ano, deixando clara a importância da realização de novos estudos e fortalecendo a ideia de investir em vacinas e rastreios moleculares^{1,2,37}.

Muitos estudos comprovaram a presença de DNA de HPV em quase 100% de carcinomas cervicais invasivos, e esta relação entre o HPV e o câncer já é bem definida. Além disso, outros estudos têm mostrado a eficiência do rastreio molecular em relação à citologia oncológica, pelo fato do teste molecular poder identificar a presença do HPV de alto risco. Já a lesão, algumas vezes não é identificada pelo profissional que avalia as lâminas de citologia⁴⁻¹¹.

Estudos para identificação do HPV começaram com a introdução do ensaio *high-risk HPV Hybrid Capture 2* (HC2), capaz de detectar o genoma todo do vírus. Posteriormente, começaram a ser desenvolvidos testes usando *polymerase chain reaction* (PCR) com conjuntos de *iniciadores* consenso da região L1 do genoma do vírus. Esses iniciadores consenso da região L1 amplificam diferentes tamanhos de fragmentos de DNA (de 65 pb com SPF10 até 455 pb com MY9/11). Há ainda ensaios que tem como alvo regiões do genoma do vírus, tais como, E1, E2, E6 e E7^{33,48,49}.

Por muito tempo se afirmou que a perda de genes que acontecem na integração do genoma do HPV ao genoma do hospedeiro, aconteceria geralmente na região E1 e E2 do genoma do vírus, porém outro estudo pôde mostrar que a deleção pode ocorrer em qualquer região do genoma do vírus, ocasionando resultados falsos negativos para DNA de HPV³⁴⁻³⁶. No presente estudo, apesar de terem sido testado alvos diferentes do genoma do HPV, a detecção entre eles foi semelhante.

Apesar de estudos mostrarem que o futuro do rastreio cervical está na biologia molecular, ainda não se sabe qual o melhor alvo, e em que método pode-se encontrar o maior equilíbrio entre sensibilidade e especificidade³⁴. Um relevante estudo aqui no Brasil, mostrou a importância dos testes moleculares para o rastreio de lesões precursoras do câncer cervical, quando comparado com a citologia, para prevenção do câncer cervical⁸.

O presente estudo teve como finalidade tentar identificar qual o melhor alvo para detecção do DNA do HPV. Nosso principal achado foi a constatação de que a concordância entre os dois métodos testados é alta. Isto pode ser percebido desde os casos considerados *IC* e inadequado até o resultado da genotipagem.

Das 414 amostras de tumores cervicais analisadas, 86% foram positivas para HPV de alto risco, dados corroborados por outro estudo que usou a plataforma *BD Onclarity HPV Assay™* em comparação com outros três métodos de detecção e genotipagem de HPV^{31,51}. Atingir 100% de positividade para HPV em tecidos tumorais do colo do útero, que é o esperado, usando apenas um método de detecção, é difícil. Um estudo que usou amostras frescas congeladas pôde chegar a 99% de positividade, utilizando vários testes para detecção do vírus⁵⁰.

Foi possível detectar, no ensaio com L1, em seis amostras de carcinomas invasivos do colo do útero, a presença do papilomavírus humano, que não havia sido detectado no ensaio com E6/E7, na plataforma *BD Onclarity*. Ou seja, dentre 57 amostras de tumores cervicais negativos para HPV com E6/E7, 6 (10,5%) amostras foram positivas para HPV no ensaio com INNO-Lipa. Porém, duas destas amostras de tumores cervicais invasivos, continham a presença de HPVs de baixo risco para câncer de colo, o HPV 6 e o HPV 11, tipos que não são identificados na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™*. Apesar de não ser frequente, outro grande estudo que envolveu 38 países também relatou casos de carcinomas cervicais invasivos contendo DNA de HPV de tipos de baixo risco⁵³. São necessários outros estudos visando confirmar a presença destes HPVs de baixo risco. De toda forma, as vacinas quadrivalente e nonavalente já abrangem os genótipos 6 e 11.

Mesmo considerando as diferenças encontradas entre os dois ensaios, tais como um HPV 45 e um HPV 16 detectados no ensaio com E6/E7, e não detectado no ensaio com L1, se analisarmos apenas as amostras válidas, a concordância entre os resultados foi de 92,8, considerada excelente pelo cálculo de Kappa. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Castro *et al.*⁵¹, que comparou 4 métodos de genotipagem em amostras de tumores cervicais fixados com formol e embebido com parafina, incluindo dois dos métodos utilizados neste estudo.

Ainda dentre as amostras com resultado discordante nos dois ensaios, temos uma amostra positiva para HPV 45 com E6/E7, que no ensaio com L1, apesar de negativa para esse genótipo, foi positiva para múltiplos genótipos (HPVs 16, 18, 68 e 83), genótipos que em um rastreamento chamariam a atenção para possíveis lesões. Cabe lembrar que o HPV 45 aparece em 3ª posição na prevalência dos tumores cervicais de alguns estudos^{31,53}.

Levando em consideração apenas os HPVs 16 e 18, temos 22 casos identificadas pelos dois métodos, o que mostra a grande sensibilidade de ambos para identificação dos dois principais tipos de HPVs, responsáveis pelo câncer do colo do útero no Brasil e no Mundo⁵³. Também mostraram igual sensibilidade para o HPV 33, tipo de alto risco que se mostra prevalente em muitos tumores do colo do útero^{31,53}.

Apesar da boa concordância, é importante buscar entender as possíveis razões para as discordâncias. A primeira é a diferença entre os ensaios, sendo a plataforma *BD Onclarity HPV Assay™*, um ensaio de PCR em tempo real, totalmente automatizado, desde a extração até a leitura dos resultados da PCR, em comparação ao ensaio com *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II*, que é um ensaio manual. Além disso, diferem os genes alvos e o tamanho do fragmento que eles amplificam, sondas, métodos de extração e forma de leitura de resultados.

A outra questão importante diz respeito às amostras cujo resultado foi negativo em ambos os testes, ainda que o anatomopatológico tenha confirmado tratar-se de carcinoma cervical invasivo. Estudos levantam algumas possíveis explicações, desde o comprimento grande do amplicon promover resultados falsos negativos, pelo fato da eficiência de uma reação de PCR geralmente diminuir com aumento do tamanho do amplicon, seja pela má fixação do material no momento da coleta, por quantidade insuficiente de formol ou uso de álcool ou outros produtos inadequados. Este tipo de problema também é recorrente em outras técnicas laboratoriais que trabalham com amostras fixadas em formol e embebidas em parafina, tais como FISH e Imunoistoquímica, onde deixar a peça fora do formol após a biópsia ou cirurgia, por um tempo prolongado, colocá-la em quantidade insuficiente de formol ou usar outros conservantes, tais como álcool ou hipoclorito

de sódio, degrada o material para análise posterior. Cabe ainda lembrar que o próprio formol também pode degradar o DNA. Em alguns casos, os falsos negativos podem ter relação com erro na classificação histológica (tumor não ser primário do colo do útero), risco afastado nesse estudo, já que as amostras foram avaliadas duas vezes pelo Setor de Anatomia Patológica do ICESP. Um estudo que testou vários métodos moleculares de genotipagem, com diferentes alvos do genoma do vírus, usando amostras frescas, pôde chegar até 99% de positividade⁵⁰, mas estudos de prevalência normalmente têm mostrado 80-90% de positividade em material parafinado, o que indica a necessidade de mais pesquisas para esclarecer as causas desses falsos negativos e a importância de garantir a qualidade na coleta e preservação das amostras^{31,50,51,53}.

Um artigo que fez uma revisão de estudos que comparam *iniciadores* consenso em L1 e PCR para tipo específico com alvo prioritariamente em E6/E7, mostrou que L1 como alvo, falhou mais em detectar infecções por HPV do que E6/E7³⁴. Já neste estudo, 4 casos (7%) dos negativos na plataforma *BD Onclarity HPV Assay™* foram positivos quando o alvo era L1.

Na PCR em tempo real realizada para HPV 16 em 3 amostras discordantes nos ensaios com L1 e E6/E7, duas foram negativas nos ensaios com PCR em tempo real para E6/E7 e E7 isolado, e positivas para o gene L1, indicando que possivelmente houve deleção do gene E7. Já a amostra que foi negativa para L1 e positiva nos ensaios com E6/E7 e E7, possivelmente teve deleção da região L1. Das 4 amostras usadas como controle, 3 confirmaram a presença de HPV 16 já detectada nos dois primeiros métodos. Uma amostra foi negativa para o ensaio cujo alvo é E7, porém essa amostra mostrou baixa quantidade de ácido nucleico no ensaio que foi feito com alvo em E6/E7, já que as amostras que cruzam o limiar

pré-estabelecido com mais de 30 ciclos, demonstram baixa quantidade de DNA⁵⁵. Também podemos observar que todas as amostras apresentam um cT mais baixo no ensaio com E6/E7 do que no ensaio com E7, o que sugere uma maior sensibilidade do *BD Onclarity*, em relação ao ensaio de PCR em tempo real com alvo em E7.

Por fim, para definir qual o melhor teste para ser usado no rastreio de grandes populações, devemos levar em consideração que o *Onclarity* realiza 30 testes por ensaio, é totalmente automatizado e tem um custo significativamente menor, o que torna mais factível a sua utilização na rotina.

9 CONCLUSÃO

Nenhum dos dois testes deste estudo pôde chegar a 100% de positividade nestes tumores cervicais, apesar da revisão histológica ter confirmado serem todos tumores primários do colo do útero. Assim sendo, esses resultados falsos negativos podem ser devidos a problemas na coleta, preservação ou dificuldade dos métodos em detectarem HPV em material parafinado, hipótese reforçada pela concordância obtida nos casos considerados inadequados para análise pelos dois métodos.

REFERÊNCIAS

1. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, United Nations, Cancer Fact Sheets, 2012. [cited 2016 Jul 15]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=16&type=0&sex=2>.
2. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saude do Brasil, Câncer do Colo do Útero, 2016. [cited 2016 Jan 6]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao.
3. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saude do Brasil, Câncer do Colo do Útero, Conceito e Magnitude, 1983 - 2013. [cited 2016 Mar 17]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/conceito_magnitude
4. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 2002;89(2):183-90.
5. Bosch FX MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J SM, Moreno V, Kurman R, Sha KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute.* 1995;87:796-802.
6. 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;189(1):12-9.
7. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-5.
8. Martins TR. Citologia líquida e teste molecular para HPV de alto risco: avaliação de novas modalidades de rastreio para prevenção de câncer de colo uterino na Rede Pública de Saúde do Estado de São Paulo [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.
9. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol Oncol.* 2015;136(2):189-97.
10. Arbyn M, Ronco G, Meijer CJ, Naucler P. Trials comparing cytology with human papillomavirus screening. *Lancet Oncol.* 2009 Oct;10(10): 935-6.
11. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human

papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(7):492-501.

12. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(4):671-7.

13. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):330-7.

14. Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2436-40.

15. Beckmann AM, Daling JR, Sherman KJ, Maden C, Miller BA, Coates RJ, et al. Human papillomavirus infection and anal cancer. *Int J Cancer.* 1989;43(6):1042-9.

16. Manias DA, Ostrow RS, McGlennen RC, Estensen RD, Faras AJ. Characterization of integrated human papillomavirus type 11 DNA in primary and metastatic tumors from a renal transplant recipient. *Cancer Res.* 1989;49(9):2514-9.

17. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(14):1072-9.

18. Arends MJ, Donaldson YK, Duvall E, Wyllie AH, Bird CC. Human papillomavirus type 18 associates with more advanced cervical neoplasia than human papillomavirus type 16. *Hum Pathol.* 1993;24(4):432-7.

19. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, et al. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(19):1361-8.

20. Rose BR, Thompson CH, Simpson JM, Jarrett CS, Elliott PM, Tattersall MH, et al. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid as a prognostic indicator in early-stage cervical cancer: a possible role for type 18. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(5):1461-8.

21. Walker J, Bloss JD, Liao SY, Berman M, Bergen S, Wilczynski SP. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol.* 1989;74(5):781-5.

22. Gal D, Friedman M, Mitrani-Rosenbaum S. Transmissibility and treatment failures of different types of human papillomavirus. *Obstet Gynecol.* 1989;73(3 Pt 1):308-11.

23. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
24. Fehrman F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22(33):5201-7.
25. Rosenstierne MW, Vinther J, Hansen CN, Prydsøe M, Norrild B. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 11):2909-20.
26. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1-17.
27. Lin BY, Makhov AM, Griffith JD, Broker TR, Chow LT. Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. *Mol Cell Biol*. 2002;22(18):6592-604.
28. Lee D, Lee B, Kim J, Kim DW, Choe J. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2000;275(10):7045-51.
29. Kissel'ov FL. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(1):68-77.
30. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *Apmis*. 2010;118(6-7):471-93.
31. Genta MLN. Genotipagem do papilomavírus humano (hpv) nos casos de câncer do colo uterino no Instituto do câncer do Estado de São Paulo no período de 2008 a 2012: [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.
32. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S7-15.
33. Karjane NW Cervical Screening. In: Rivlin ME, editor. MEDSCAPE; 2016. [cited 2016 Feb 12]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1618870-overview#a2>
34. Tjalma WA, Depuydt CE. Cervical cancer screening: which HPV test should be used--L1 or E6/E7? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;170(1):45-6.
35. Ferraro CTL, Canedo NHS, Oliveira SPd, Carvalho MdGC, Dias EP. Infecção Oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47:451-9.

36. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet.* 2015;47(2):158-63.
37. El-Zein M, Richardson L, Franco EL. Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: Cytology, molecular testing, both or none. *J Clin Virol.* 2016;76 Suppl 1:S62-s8.
38. Ali H, Donovan B, Wand H, Read TR, Regan DG, Grulich AE, et al. Genital warts in young Australians five years into national human papillomavirus vaccination programme: national surveillance data. *BMJ.* 2013;346:f2942.
39. Gertig DM, Brotherton JM, Budd AC, Drennan K, Chappell G, Saville AM. Impact of a population-based HPV vaccination program on cervical abnormalities: a data linkage study. *BMC Med.* 2013;11:227.
40. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saude do Brasil, Prevenção do câncer de colo do útero, 2017. [cited 2016 Dec 18]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uteroprevencao+.
41. Hopenhayn C, Christian A, Christian WJ, Watson M, Unger ER. Prevalence of human papillomavirus types in invasive cervical cancers from seven US cancer registries prior to vaccine introduction. *J Low Genit Tract Dis.* 2014 Apr; 18(2): 182-189.
42. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(3):249-57.
43. Vijayaraghavan A, Efrusy M, Lindeque G, Dreyer G, Santas C. Cost effectiveness of high-risk HPV DNA testing for cervical cancer screening in South Africa. *Gynecol Oncol.* 2009;112(2):377-83.
44. van Rosmalen J, de Kok IM, van Ballegooijen M. Cost-effectiveness of cervical cancer screening: cytology versus human papillomavirus DNA testing. *BJOG.* 2012;119(6):699-709.
45. U.S. Preventive Services Task Force, Cervical Screening recommendations 2012. [cited 2016 Jan 15]. Available from: <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/Page/Document/UpdateSummaryFinal/cervical-cancer-screening>.

46. de Kok IM, van Rosmalen J, Dillner J, Arbyn M, Sasieni P, Iftner T, et al. Primary screening for human papillomavirus compared with cytology screening for cervical cancer in European settings: cost effectiveness analysis based on a Dutch microsimulation model. *BMJ*. 2012;344:e670.
47. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, 2014. FDA approves first human papillomavirus test for primary cervical cancer screening. [cited 2016 Dez 6]. Available from: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm510251.htm>
48. 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):368-83.
49. Ejegod DM SI, Cuschieri KS, Nussbaumer WA, Vaughan LM, Ahmad AS, Cuzick J, et al. J. Clinical Validation of the BD Onclarity HPV Assay Using a Non-Inferiority test. *J Microb Diagn*. 2013, (3):003
50. Oliveira CM. Existe câncer cervical HPV negativo? [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo: 2011.
51. Castro FA, Koshiol J, Wim Q, Wheeler CM, Gillison ML, Vaughan LM, et al. Detection of HPV DNA in paraffin embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. *BMC Infec Dis*; 2015, (15):544.
52. Poljak M, Kocjan BJ, Ostrbenk A, Seme K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J Clin Virol*. 2016;76 Suppl 1:S3-s13.
53. 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;11(11):1048-56.
54. Pereira LMG, Santos JGF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An. Bras. Dermatol*. [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Dec 08]; 86(2):306-317. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000200014&lng=en.
55. Nascimento S, Suarez ER, Pinhal MAS. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *Rev Bras Med* [internet]. Nov 2010 [citado em 20 out 2017];(67):7-19. Disponível em: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4499