



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PÓS- GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

ELIANE DA SILVA RIBEIRO

**IMPORTÂNCIA DO HPV NO CARCINOMA DO COLO UTERINO E A  
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO R72P DO GENE TP53 E A  
RADIOTERAPIA**

JUNHO  
2012

ELIANE DA SILVA RIBEIRO

**IMPORTÂNCIA DO HPV NO CARCINOMA DO COLO UTERINO E A  
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO R72P DO GENE TP53 E A  
RADIOTERAPIA**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Mestrado em Genética, da Pró-reitora de pós-graduação e pesquisa, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de mestre em genética.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dra Renata de Bastos Ascenço Soares

**Co-orientadora:** Dra Juliana Castro Dourado Pinezi

JUNHO  
2012

Ribeiro, Eliane da Silva.

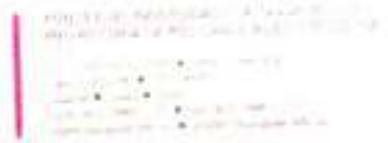
R484i Importância do HPV no Carcinoma do colo uterino e a associação com o polimorfismo R72P do gene TP53 e a radioterapia [manuscrito] / Eliane da Silva Ribeiro. – 2012. 80 f. : il.; grafs.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2012.

“Orientadora: Profa. Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares”.

1. Colo uterino - Câncer. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Câncer - Radioterapia. I. Título.

CDU: 618.14-006(043)



PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO E DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DE MESTRADO

- 1 No dia 29 de junho de 2012, reuniu-se a 5ª Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, composta  
2 pelos membros: Prof.ª Dr.ª Renata de Bastos Ascenço Soares / PUC Goiás (Presidente), Prof.ª Dr.ª Vera  
3 Aparecida Saddi / PUC Goiás e Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Rabelo / UFG, para avaliação da dissertação  
4 intitulada "Importância do HPV no Desenvolvimento do Carcinoma Escamoso do Colo Uterino e a  
5 **Influência no Prognóstico com a Radioterapia**", da candidata **Eliane da Silva Ribeiro**, aluna do  
6 Mestrado em Genética (MGene) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. A sessão iniciou-se  
7 às 9 h 10 min., na sala de estudos do MGene, sob a presidência da Prof.ª Renata de Bastos Ascenço  
8 Soares, que concedeu 30 minutos à candidata para expor sinteticamente o estudo. A seguir, a arguição  
9 procedeu-se de forma interativa. Ao final da defesa, a sessão foi suspensa e a Comissão se reuniu em  
10 separado para avaliação e atribuição de nota. Discutido o trabalho e o desempenho da mestranda, a  
11 Banca Examinadora considerou-a **aprovada** com a nota 9,5 ( nove e meio )  
12 equivalente ao conceito " A ". Portanto, a discente foi declarada **Mestre em Genética pela Pontifícia**  
13 **Universidade Católica de Goiás**, pela Presidente da Banca Examinadora, que encerrou a sessão  
14 às 11 h 35 min. Não havendo nada mais a tratar, a presente ata foi lavrada e assinada pelos membros  
15 da Banca Examinadora.  
16 Prof.ª Dr.ª Renata de Bastos Ascenço Soares Renata Bastos  
17 Prof.ª Dr.ª Vera Aparecida Saddi Vera Aparecida Saddi  
18 Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Rabelo Silvia Rabelo  
19 Esta ata contém 19 linhas contínuas, sem rasuras, emendas ou retificação.



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Av. Universitária, 1500 • Setor Universitário  
Cidade Nova de Goiás • CEP 74605-910  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 2466-1000 • Fax: (62) 2466-1005  
www.pucgoias.edu.br • puc@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA DA  
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA E APROVADA EM 29 DE JUNHO  
DE 2012 COM CONCEITO A

**BANCA EXAMINADORA**

*Renata BA Soares*

Prof.ª Dr.ª Renata de Bastos Asencço Soares  
(presidente-orientadora)

*Vera Aparecida Saddi*

Prof.ª Dr.ª Vera Aparecida Saddi  
(membro interno)

*Silvia Helena Rabelo*

Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Rabelo / UFG  
(Membro externo)

## **Fomento e Instituições**

### **Fomento:**

- Chamada Pública - Fortalecimento da Ciência: Pesquisa em Gênero CH 002/2008
- Bolsa FAPEG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás. Bolsa de formação – N.º1528, Chamada Pública: N.º 002/2010.

### **Instituição participante:**

Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Instituto de Ensino e Pesquisa, Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço a Deus por me fazer acreditar que conseguiria e me dar forças para concluir.

Esse trabalho não poderia ter sido realizado, se não fosse a colaboração de várias pessoas, às quais agradeço intensamente.

Ao meu esposo Américo, e meus filhos Natália e Gabriel pela imensa paciência, incentivo, força, pelo carinho diário, por acrescentar razão aos meus dias e por compreender as minhas inúmeras ausências noturnas e finais de semana.

Aos meus pais pelo exemplo, carinho e pela boa educação que sempre me deram.

As minhas irmãs, Luciane, Rosana, Adriana e Andréia pelo incentivo e apoio mesmo que a distância.

A amiga Daniela Passos pela contribuição inestimável para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos de bancada, e por tornar o trabalho árduo em um ambiente bem humorado e leve.

A Professora Renata Soares pela orientação, por se manifestar sempre disposta a ajudar, além do bom convívio, compreensão e pela amizade que surgiu durante esses dois anos. O meu sincero obrigada pelo conhecimento e motivação que me transmitiu e pela confiança depositada.

As amigas Hellen e Ana Terra pela contribuição inestimável para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos de bancada, pelo auxílio na elaboração de parte da análise estatística e por sempre se dispor a ajudar.

A todos os colegas do Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia pelo apoio nos momentos difíceis, em especial a Nathany e Jecielle pela ajuda no recrutamento das pacientes.

A Dra. Juliana pelas orientações especializadas referentes à radioterapia, que me ajudou a compreender as associações deste trabalho.

A todas as pacientes que, imbuídas num espírito de solidariedade, gentilmente permitiram a realização deste estudo.

A Ana Cecília pelo apoio e maleabilidade em meus horários no Centro de Referência e Diagnóstico Terapêutico.

## ÍNDICE

---

	Página
Ata da Sessão de apresentação e defesa pública	iii
Agradecimentos	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
1.1. - Papillomavírus Humano (HPV)	14
1.2 - Câncer de colo uterino	23
1.3 - Gene TP53	28
1.4 - Radiossensibilidade	33
2. Objetivos	37
3. Metodologia	37
3.1 - Seleção de pacientes	37
3.2 - Extração de DNA	39
3.3 - Amplificação do DNA e genotipagem do HPV	39
3.4 - Amplificação das regiões do TP53 e sequenciamento	40
3.5 - Análise estatística	42
4. Resultados	43
4.1 - Características clínicas	43
4.2 – Frequência de HPV nas amostras estudadas	46
4.3 – Análise do gene TP53	48
4.4 – Associação com a Radioterapia	50
5. Discussão	55
6. Conclusões	63
7. Referências	64
8. Anexos	70
8.1 - Anexo 1	70
8.2 - Anexo 2	71
8.3 - Anexo 3	73

## LISTA DE FIGURAS

---

	Página
Figura 1 - Árvore filogenética inferida a partir das sequências de nucleótidos de L1 de 189 papilomavírus.	15
Figura 2- Estrutura e organização do genoma do HPV.	16
Figura 3 - Oncoproteínas E6 e E7.	18
Figura 4 - Etapas do ciclo celular do HPV.	21
Figura 5 - Mecanismos da carcinogênese pelo HPV.	22
Figura 6 - Casos novos estimados - sexo feminino.	24
Figura 7 - Representação esquemática da estrutura da proteína p53.	30
Figura 8 - Representação esquemática da organização do gene TP53.	31
Figura 9 - Localização do gene TP53 no cromossomo 17.	32
Figura 10 - Distribuição de casos de câncer de colo uterino conforme idade.	44
Figura 11- Prevalência dos genótipos de HPV na amostra estudada.	47
Figura 12 - Distribuição dos genótipos do fragmento do codon 72 do gene Tp53	48
Figura 13 - Relação entre HPV único ou múltiplo e do fragmento arg72Pro do Tp53.	50
Figura 14 - Variação de BED total em TGU e TGI.	52
Figura 15 - Distribuição do grau de toxicidade conforme RTOG no trato gastrointestinal (TGI) e no trato genitourinário (TGU) da amostra.	53

## LISTA DE TABELAS

---

	Página
Tabela 1 – Estadiamento cirúrgico do câncer do colo do útero. Correspondência com a classificação TNM.	26
Tabela 2- Escala de toxicidade aguda do RTOG.	36
Tabela 3- Características clínicas.	45
Tabela 4 Distribuição dos tipos de HPV da amostra	46
Tabela 5 - Associação com HPV16.	47
Tabela 6- Associação dos subtipos de HPV com os genótipos de TP53.	49
Tabela 7 - Associação com toxicidade do trato gastrointestinal conforme RTOG.	53
Tabela 8 - Associação da toxicidade do trato genitourinário conforme RTOG	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

- ACCG** - Associação de Combate ao Câncer em Goiás
- Arg** - Arginina
- ATM** - *Ataxia telangiectasia mutated*
- ATPase** - Enzima que catalisa hidrólise do ATP
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- BED** - *Biological effective dose*
- CACON** - Centro de atendimento de alta complexidade em oncologia
- CTD** - *C-terminal domain*
- DBD** - *DNA binding domain*
- ddNTPs** - Dideoxynucleotídeos trifosfato
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- E** - *Early*
- E\*** - Sinal de exportação nuclear
- EGFR** - Receptores do fator de crescimento epidérmico
- FIGO** - *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*
- Gy** - Grays
- HAJ** - Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge
- HAS** - Hipertensão arterial sistêmica
- HDR** - *Hight Dose Radiotherapy*
- HSIL** - Lesão intraepitelial de alto grau
- HPV** - Papilomavírus humano
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer
- L** - *late*
- L\*** - Sinal de localização nuclear
- LA** - *Roche linear array*
- LCR** - *long control region*
- MDM2** - *Murine double minute-2*
- NIC** - Neoplasia intraepitelial cervical
- ORFs** - *Open reading frames*
- P21** - Proteína p21
- P53** - Proteína p53
- PCR** - *Polimerase chain reaction*
- pRb** - Proteína retinoblastoma
- PRD** - Domínio rico em prolina
- Pro** - Prolina
- 4D** - Domínio tetramerização

**RTOG**- *Radiation therapy oncology group*

**SNP** - *Single nucleotide polymorphism*

**TAD** - Domínio de transativação N-terminal

**TCLE** - Termo de consentimento livre e esclarecido

**TP53** - Gene *p53*

**TNM** - Classificação de tumores malignos

**TGI** - Trato gastrointestinal

**TGU** - Trato genitourinário

**UICC** - *Union Internationale Contrele Cancer*

**URR** - *Upstream regulatory region*

**VLP** - *Virus-like particles*

## RESUMO

---

A persistência do Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco, é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Contudo, apenas os HPV de alto risco estão associados ao câncer. Esta habilidade carcinogênica deve-se a interação entre a proteína E6 do HPV com proteína p53, considerado o principal evento deste processo do desenvolvimento de tumores. O presente estudo avaliou os genótipos dos HPV; O sequenciamento do fragmento que contém o polimorfismo Arg72Pro do gene TP53; A associação destes fatores entre si com a radiosensibilidade das pacientes com câncer de colo uterino selecionadas no Serviço de Radioterapia, do Hospital Araujo Jorge, da ACCG. Vinte e sete pacientes com câncer de colo uterino encaminhadas para a radioterapia foram selecionadas para este estudo prospectivo. O DNA foi extraído de células descamativas cervicais colhidas com *cytobrush*. Foi realizada a genotipagem do HPV através da hibridização reversa e a avaliação da presença do polimorfismo Tp53 foi realizada pelo sequenciamento do fragmento Arg72Pro. Os dados foram avaliados de acordo com a média de idade, grau de diferenciação do tumor, estadiamento clínico do tumor e incidência de efeitos colaterais de acordo com os critérios do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG). A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS 17.0 para Windows. A média de idade das pacientes foi de 54 anos ( $\pm 16,3$ ). A incidência de efeitos colaterais agudos (RTOG) foram: reações no trato gastrointestinal inferior (TGI): grau 0 – 1 (59,6%) e grau  $\geq 2$  (40,4%); reações no trato genurinário (TGU): grau 0 - 1 (86,4%) e grau  $\geq 2$  (13,6%). O grau de toxicidade aguda  $\geq 2$  do TGI associou-se com a idade, onde as pacientes com  $\geq 50$  anos, apresentaram um risco relativo de 1,8 vezes maior (1,1 - 2,8; IC 95%) de radiosensibilidade e com infecção por múltiplos tipos de HPV, um risco relativo 2,6 vezes maior (0,8 - 8,2; IC 95%). A resposta terapêutica após dois meses do tratamento: 16 (59,3%) pacientes com remissão total da doença, sete (25,9%) com doença em atividade/óbito. A presença do HPV foi observada em 26 (96,3%) pacientes, o genótipo do HPV mais prevalente foi HPV 16 (61,5%), seguido pelo HPV 52 (19,2%) e HPV 18 (11,5%). A infecção por um único tipo de HPV foi observado em 19 (73,1%) pacientes e sete (26,9%) apresentavam mais de um genótipo de HPV. Observamos a presença do genótipo Arg/Arg em oito (33,3%), Arg/Pro em 15 (62,5%) e Pro/Pro em uma (4,2%). As pacientes com genótipo (Arg/Arg) apresentaram maior risco de ter infecção por múltiplos vírus (RR= 1,77; 1,15-2,73;  $p=0,04$ ). E esta coinfeção múltipla com um maior risco de radiosensibilidade aguda grave no TGI, com um risco relativo de 2,6 vezes maior ( $p=0,03$ ).

**Palavras-chave:** câncer de colo uterino, polimorfismo, radioterapia

## ABSTRACT

---

Persistent Human Papillomavirus (HPV) high risk, is the most important risk factor for development of cervical cancer. However, only high risk HPV types are associated with cancer. This ability carcinogenic due to interaction between HPV E6 protein with p53 protein, considered the main event of this process of tumor development. The present study evaluated the genotypes of HPV; Sequencing of the fragment coding the polymorphism Arg72Pro TP53, the association of these factors together with the radiosensitivity of patients with cervical cancer in selected Radiotherapy Service, Hospital Jorge Araujo, the ACCG. Twenty-seven patients with cervical cancer referred for radiotherapy were selected for this prospective study. DNA was extracted from cells harvested with cervical squamous cytobrush. Was performed HPV genotyping by reverse hybridization and evaluation of the presence of TP53 polymorphism was performed by sequencing of fragment Arg72Pro. Data were evaluated according to the average age, level of differentiation do tumor, clinical stage of the tumor and the incidence of side effects according to the criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG). Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 for Windows. The mean age of patients was 54 years ( $\pm 16.3$ ). The incidence of acute side effects (RTOG) were reactions in the lower gastrointestinal tract (GIT): grade 0-1 (59.6%) and  $\geq$  grade 2 (40.4%); reactions tract genitourinary (TGU): degree 0-1 (86.4%) and  $\geq$  grade 2 (13.6%). The degree of acute toxicity TGI  $\geq 2$  was related to the age where the patients  $\geq 50$  years old, had a relative risk of 1.8 times greater (1.1 - 2.8; 95%) of radiosensitivity and infection with multiple HPV types, a relative risk 2.6 times higher (0.8 to 8.2, 95% CI). Therapeutic response after two months of treatment: 16 (59.3%) patients with complete remission, seven (25.9%) with active disease / death. The presence of HPV was observed in 26 (96.3%) patients, HPV genotype was more prevalent HPV 16 (61.5%), followed by HPV 52 (19.2%) and HPV 18 (11.5% ). Infection of a single HPV type was observed in 19 (73.1%) and seven (26.9%) had more than one HPV genotype. We observed the presence of genotype Arg / Arg in eight (33.3%), Arg / Pro in 15 (62.5%) and Pro / Pro in one (4.2%). Patients with genotype (Arg / Arg) had a higher risk of having multiple virus infection (RR = 1.77, 1.15 to 2.73,  $p = 0.04$ ). And this multiple coinfection with an increased risk of severe acute radiosensitivity in the GIT, with a relative risk of 2.6 times greater ( $p=0,03$ ).

**Keywords:** cervical cancer, polymorphism, radiotherapy

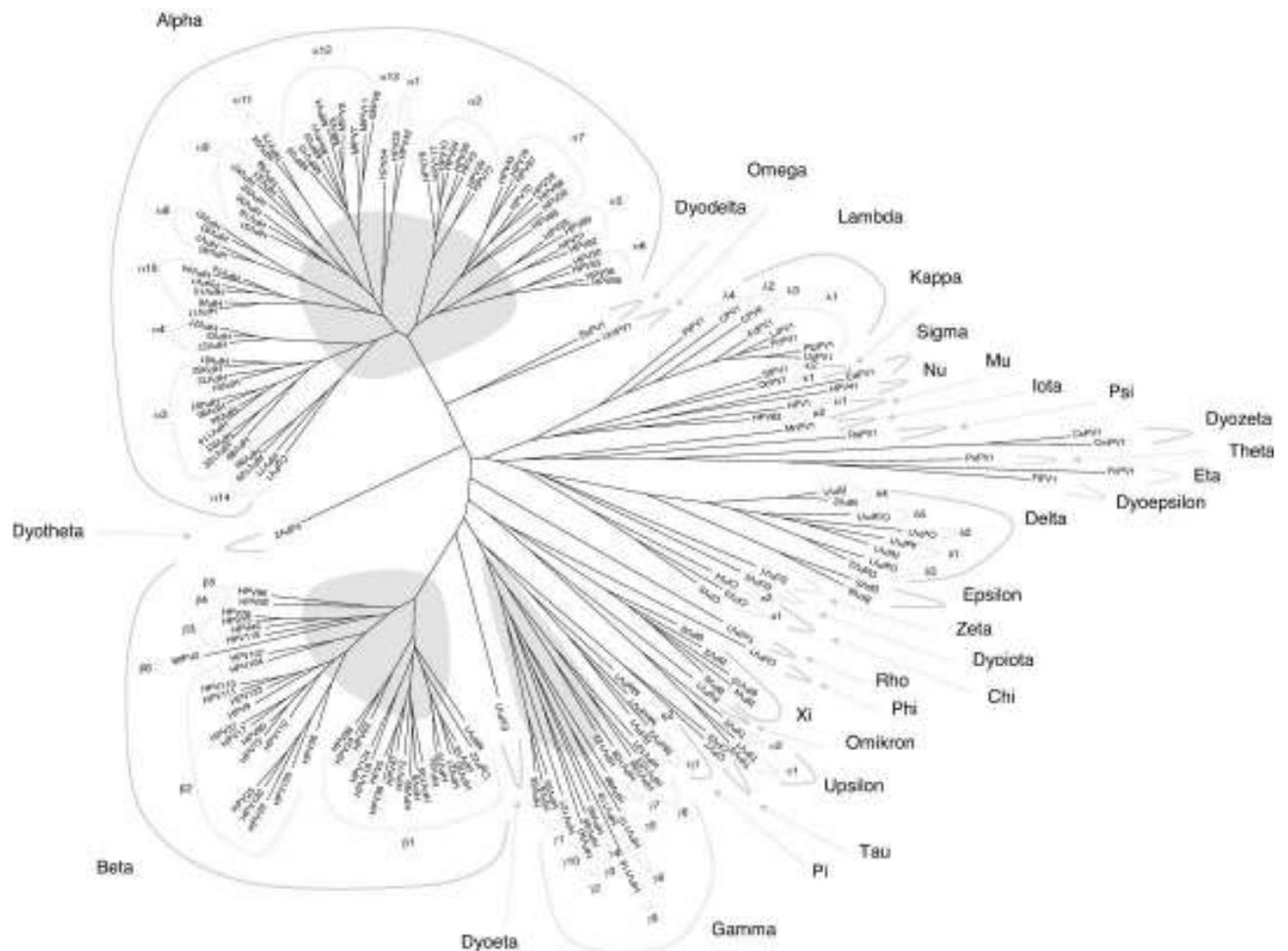
## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV foi identificado no final da década de 60 (1), e a primeira descrição de células alteradas por este vírus no epitélio vaginal coube a George Papanicolaou (2). Apresentam tropismo tecidual, o que se deve ao fato de diferentes tipos celulares expressarem receptores específicos para o vírus (2-3). O HPV tem preferência para infecções cutâneas ou mucosas (4). São pequenos vírus de DNA circular de cadeia dupla e o seu genoma é constituído por cerca de 8000 pares de bases, que codificam 300.000 daltons de proteína (3, 5). Apesar do seu pequeno tamanho, a sua biologia molecular é muito complexa (3, 6). Possuem uma capsídeo icosaédrico de 55nm, com 72 capsômeros e não contêm invólucro lipídico (1, 3, 6-7).

O HPV é membro da família *Papillomaviridae* (3). Atualmente estão descritos e identificados cerca de 180 tipos de papilomavírus, cerca de 120 tipos infectam humanos (3, 5, 8) e pelo menos mais 100 tipos estão parcialmente sequenciados (7). A homologia das sequências dos vários HPV e as pequenas variações entre elas permitiram a classificação dos HPV em gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes. Esta classificação baseou-se na comparação das sequências que codificam as proteínas L1 (3, 5-7). Estão descritos 29 gêneros diferentes (5). Os gêneros clinicamente mais importante são o  $\alpha$ -papilomavírus que contém todos os tipos de HPV associados às lesões nas mucosas e o  $\beta$ -papilomavírus inclui todos os tipos de vírus associados às epidermodisplasias verruciformes (3, 9) (Figura 1).

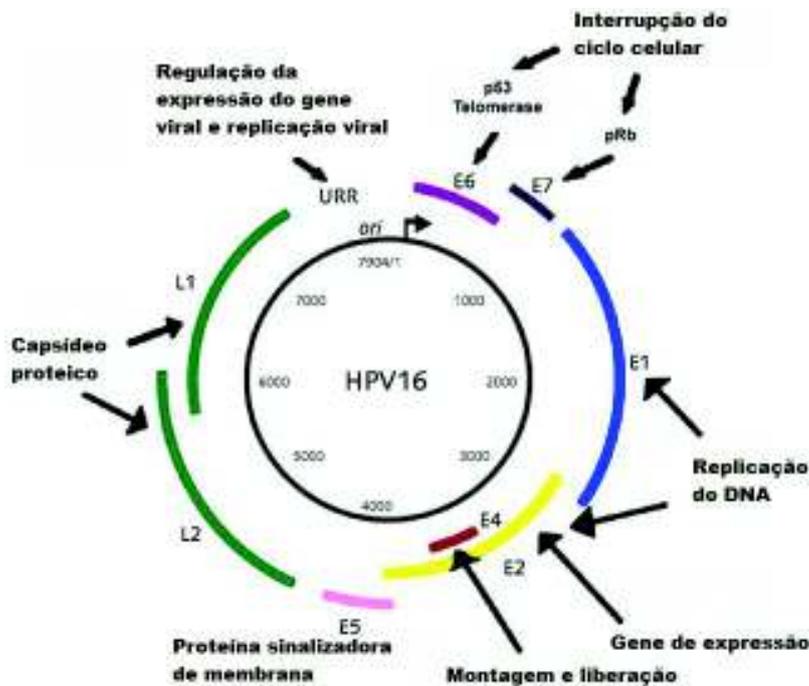


**Figura 1** - Árvore filogenética inferida a partir das sequências de nucleótidos de L1 de 189 papilomavírus (adaptado, Bernard, 2010) (8).

Do ponto de vista epidemiológico e com base na associação dos diferentes HPV com o colo do útero, os HPV foram classificados em tipos de alto e de baixo risco. Os tipos de alto risco estão predominantemente associados com as lesões pré-malignas e o câncer colo do útero, enquanto que os tipos de baixo risco são comumente detectados em verrugas genitais (10). Considera-se que os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são de alto risco, enquanto os tipos 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89 são classificados como de baixo risco (11).

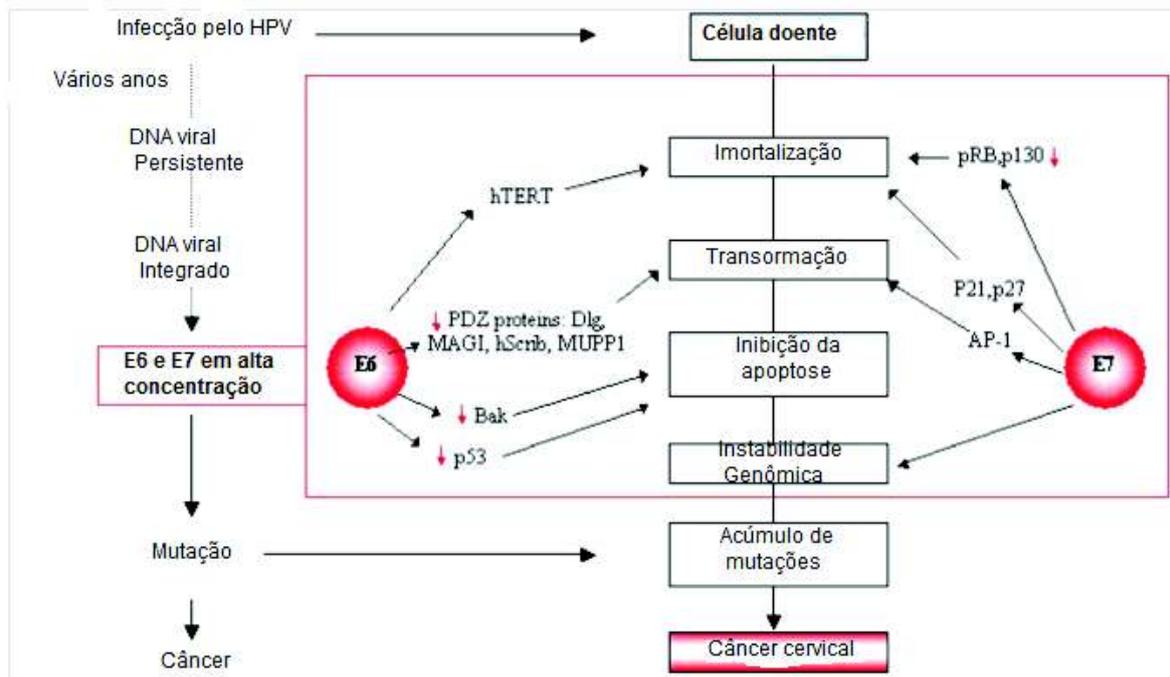
Os HPV de alto risco provável incluem os tipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82, e os de risco indeterminado os tipos 30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91. (11-12). Deste modo, infecções persistentes com tipos de HPV de alto risco são determinantes na patogênese do carcinoma do colo do útero (13) e são estes que estão frequentemente integrados no genoma da célula hospedeira (14).

Apenas uma das cadeias do DNA viral serve de molde para a expressão dos genes virais, permitindo a codificação de transcritos de mRNA. Todas as regiões codificantes denominadas de região de leitura aberta (ORFs), de tamanho aproximado de 400 bases, estão localizadas nesta única cadeia (15). O genoma do HPV pode ser dividido em, três domínios: uma região não-codificante reguladora (URR- upstream regulatory region ou LCR- long control region); uma região precoce, que contém 6 ORFs (E6, E7, E1, E2, E4 e E5), e uma região tardia que codifica as duas proteínas da cápside, L1 e L2 (16-17) (Figura 2).



**Figura 2-** Estrutura e organização do genoma do HPV (adaptado de Burk, 2009) (17)

Os genes virais são denominados de precoces (early, E) ou tardios (late, L), dependendo de quando são expressos durante seu ciclo de vida (18). A região reguladora (URR ou LCR) do HPV não codifica proteínas, mas contém a origem de replicação e a maioria dos promotores de transcrição viral(6). A região precoce codifica proteínas necessárias à replicação do DNA e que estão envolvidas na transformação celular e oncogênese. As proteínas E1 e E2 estão envolvidas na replicação do DNA viral. A proteína E1 possui atividade de helicase, ATPase e de ligação ao ATP. A proteína E2 reprime a expressão dos genes E6 e E7 necessários para a manutenção do genoma viral em infecções persistentes. A proteína E4 rompe os filamentos de queratina das células, facilitando, deste modo, a libertação de partículas de HPV. A proteína E5 interage com os domínios transmembranares dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), controlando a sua concentração e fosforilação, inibindo as respostas imunológicas do hospedeiro (1). As proteínas E6 e E7 estão intimamente relacionadas com a oncogênese, uma vez que são responsáveis por alterações no metabolismo celular do hospedeiro, através da sua ligação aos produtos dos genes supressores de tumores, TP53 e pRb (1, 13, 15, 18) (Figura 3). A região tardia codifica as proteínas estruturais do capsídeo (L1 e L2) (6, 10, 13, 19).



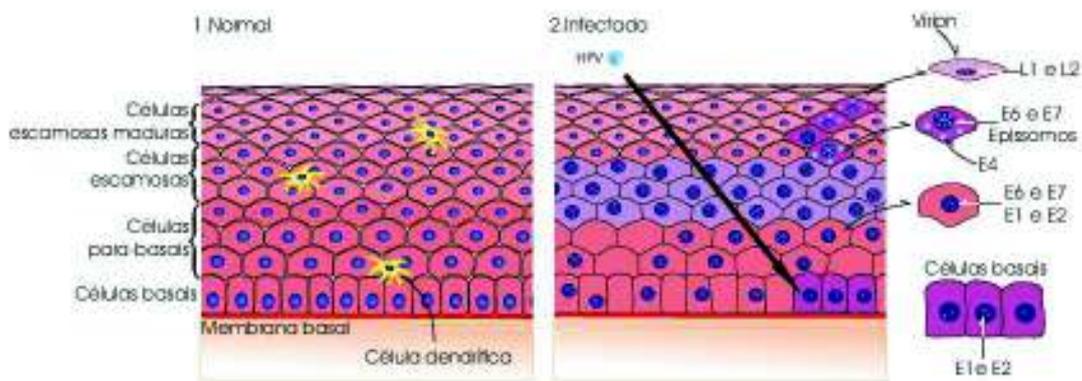
**Figura 3** - Oncoproteínas E6 e E7. Alguns dos alvos celulares são destacados juntamente com as suas respectivas posições na progressão para malignidade (adaptado Grm, 2009) (20).

O ciclo de vida do HPV depende da diferenciação das células epiteliais. Acredita-se que a infecção pelo vírus inicia-se nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico. À medida que se dividem, as células basais e parabasais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas. Ao se dividirem, as células infectadas pelo HPV distribuem equitativamente o DNA viral entre as duas células filhas. Uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece indiferenciada na camada basal, servindo como reservatório do DNA viral. Para que os vírus infectem as células da camada basal é necessário que ocorra perda da integridade do epitélio, como é o caso de microerosões ou traumatismos na pele ou mucosas (21).

O padrão de expressão gênica nas células basais infectadas pelo HPV ainda não é bem conhecido, acreditando-se que as proteínas E1 e E2 sejam expressas para manter o DNA viral na forma episomal e para facilitar a correta segregação do genoma viral durante a divisão celular. Ainda não se sabe se as proteínas E6 e E7 são expressas, no ciclo produtivo, nas células da camada basal; admite-se que a expressão de E1 e talvez de E2 seja suficiente para a manutenção basal dos episomos virais (21-22).

Para a produção de vírions infectantes, os vírus devem replicar seu genoma e empacotá-lo em partículas. Isto ocorre nas células das camadas média ou superficial do epitélio, após aumento na atividade do promotor tardio. A replicação ocorre em células em proliferação e requer a expressão de E4 e E5, cujas funções na replicação não estão bem definidas. A ligação de E2 à região regulatória do DNA viral é necessária para que ocorra a replicação viral e recrutamento da proteína E1, que atua como uma helicase, na origem da replicação. Dessa forma, ocorre a replicação do DNA viral nas camadas basais e parabasais, seguida da montagem do capsídeo viral nas camadas mais superficiais do epitélio (21).

Para a síntese viral ser finalizada, o vírus do papiloma humano codifica as duas proteínas estruturais, L1 e L2, as quais são expressas nas camadas superficiais do epitélio. Desse modo, são formadas partículas virais que são liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio, uma vez que o HPV não possui ciclo lítico(21). A figura 4 ilustra os principais estágios do ciclo celular do HPV.

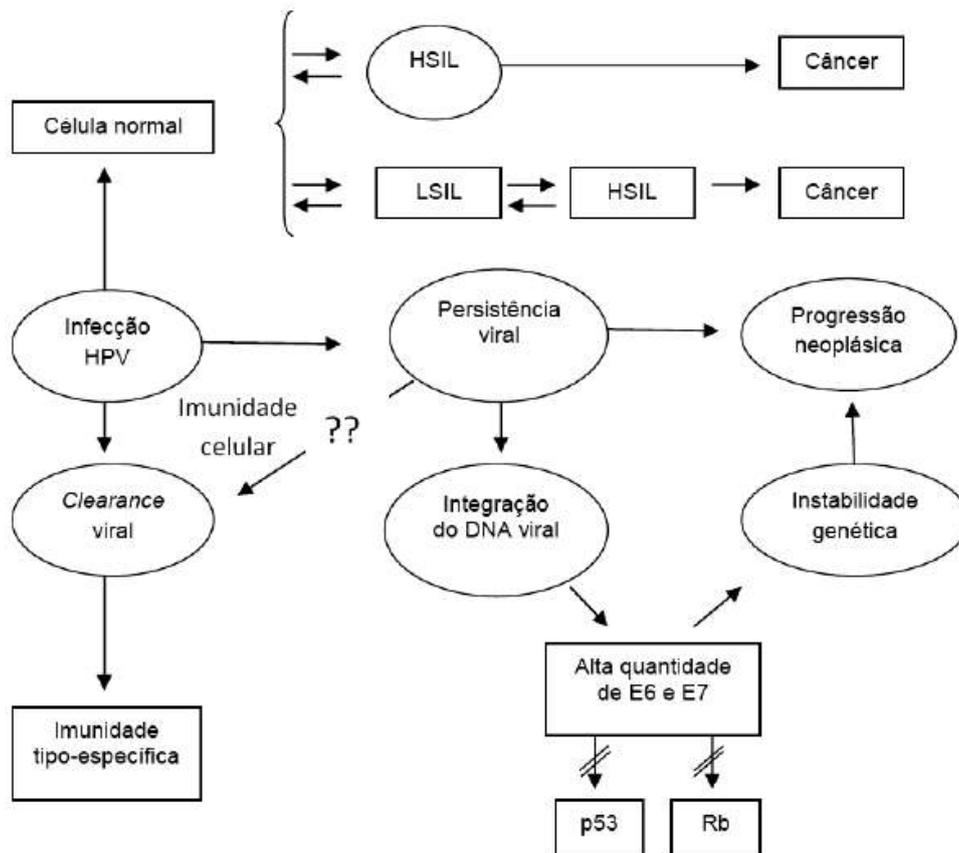


**Figura 4** - Etapas do ciclo celular do HPV. Adaptado de Munoz, 2006. (23)

Se a infecção persiste, distúrbios no controle da replicação do HPV de alto risco podem levar à integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, causando transformação celular. A integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro leva à sua linearização entre os genes E1 e L1 e a inativação do gene E2, por corte ou deleção no momento da integração. O gene E2 codifica uma proteína responsável pela regulação da expressão dos genes E6 e E7; sua perda induz a expressão “descontrolada” dos genes E6 e E7, acelerando o processo de transformação e de imortalização celular, resultando nas alterações fenotípicas nas células (22, 24). Em células não infectadas, a diferenciação levaria à saída do ciclo celular, mas as células infectadas permanecem no ciclo ativo devido a ação de E7 que mantém a replicação viral (22).

As infecções transitórias pelo HPV são bastante comuns em mulheres jovens sexualmente ativas. A maioria dessas infecções é subclínica e cura-se espontaneamente; apenas uma minoria desenvolve infecção persistente. Quando

infectadas por HPV de alto risco, as lesões podem evoluir para lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e, algumas delas, progredem para carcinoma invasor (19). A Figura 5 mostra de forma esquemática alguns dos principais componentes da evolução da infecção pelo HPV para o câncer (25).



**Figura 5** - Mecanismos da carcinogênese pelo HPV. Adaptado de Bosch 2002. (25)

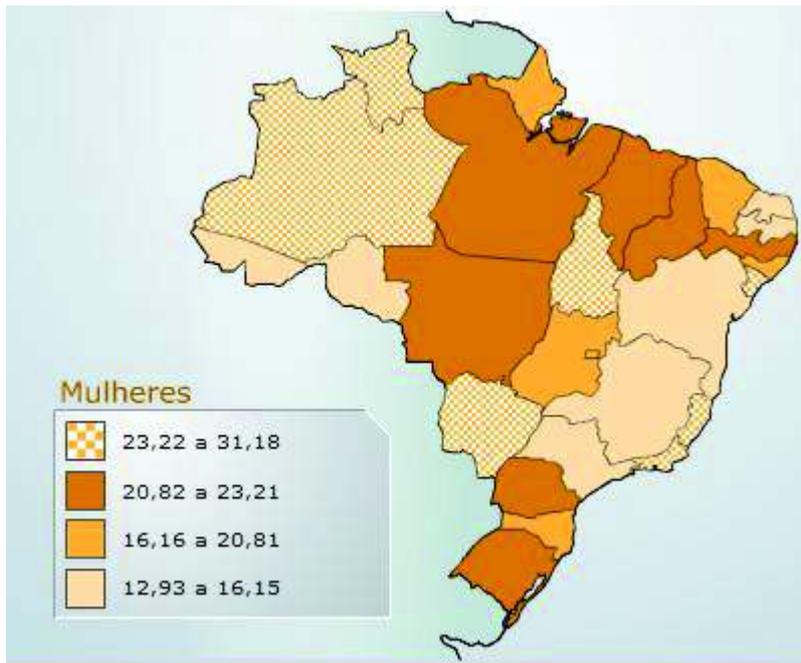
Vários estudos demonstram a forte associação entre a progressão neoplásica relacionada ao HPV e o estado imunológico. Os mecanismos exatos que disparam a resposta imunológica eficiente contra as lesões provocadas pelo HPV, no entanto, não são ainda totalmente conhecidas (22). A participação do sistema

imunitário é fator crucial na evolução da infecção pelo HPV, pois pode eliminar o vírus ou permitir sua persistência no hospedeiro. O que já está bem estabelecido por estudos de coorte prospectivos é que as lesões pré-cancerosas (neoplasias intraepiteliais cervicais) podem regredir, persistir ou progredir para invasor (26).

Atualmente estão disponíveis dois tipos de vacinas contra HPV: a bivalente, Cervarix®, que cobre os sorotipos virais 16 e 18 e a quadrivalente, Gardasil®, que cobre os tipos 6, 11, 16 e 18. Ambas as vacinas são produzidas a partir da proteína L1 do capsídeo viral por tecnologia de DNA recombinante resultando em *virus-like particles* (VLP), partículas semelhantes aos vírus, mas que não possuem DNA e, portanto, não são infectantes. São capazes de induzir a produção de anticorpos contra os tipos específicos de HPV contidos na vacina (27-28). Inicialmente a vacina protege contra os tipos de HPV nela presentes. Contudo, pode haver proteção cruzada pela similaridade genética entre alguns sorotipos. A vacina quadrivalente parece proporcionar proteção cruzada parcial (em torno de 59%) contra os sorotipos 31 e 45. Apesar de esses dados ainda não estarem confirmados, também há indícios de proteção cruzada contra os tipos 33, 52 e 58.(28) Os ensaios de fase III em curso sugerem uma proteção parcial contra dez sorotipos não incluídos na vacina, inclusive os já mencionados (28).

## **1.2 - Câncer de colo uterino**

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, sendo responsável pelo óbito de 275 mil mulheres por ano (29). No ano de 2008, estimou-se uma incidência de 19/100.000 mulheres, no Brasil, correspondendo a 18.680 casos novos/ano, evidenciando, portanto, uma redução, comparativamente ao ano de 2006 (20,3/100.000 mulheres) (figura 6). Para o ano de 2012, esperam-se 17.540 casos novos deste câncer, com um risco estimado de 12 casos a cada 100 mil mulheres(30) . A maior incidência do câncer de colo de útero acomete mulheres com idades entre 40 e 60 anos, sendo menos frequente antes dos 30 anos, isso se deve ao longo período da evolução da infecção inicial pelo HPV no início das atividades sexuais, na adolescência ou até por volta dos 20 anos, até o aparecimento do câncer. Porém, esse quadro vem se modificando aos poucos e o aparecimento de lesões precursoras está ocorrendo cada vez mais precocemente, devido à iniciação cada vez mais antecipada das atividades sexuais associada aos demais fatores de risco (30-32).



**Figura 6** - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres estimadas para o ano de 2012. Fonte: INCA, 2011 (30).

As taxas de mortalidade por câncer do colo do útero são elevadas, constituindo-se em um grave problema de Saúde Pública. A série histórica divulgada pelo Ministério da Saúde com dados de 1979 a 2005 demonstra que nesse período as taxas de mortalidade ajustadas por idade passaram de 4,97 para 5,29 por 100.000 mulheres, o que representa um incremento de 6,4% em 26 anos (33). Em Goiás a taxa de mortalidade de 2009 foi de 5,6/ 100 mil mulheres (34). No Brasil, ocorreram 4.986 mortes por este câncer em 2010 (32).

O câncer cervical vem sendo relacionado com vários cofatores ao longo dos tempos. Hoje são conhecidos os seguintes cofatores de risco para lesões cervicais: doenças sexualmente transmissíveis; condições infecciosas e reativas; hábitos sexuais, como início precoce e multiplicidade de parceiros; tabagismo ativo e

passivo; uso prolongado de anticoncepcionais orais; carências nutricionais; receio da cliente em realizar o exame devido ao medo, vergonha, ansiedade, ignorância e dificuldade de acesso aos serviços de saúde para realização de exame preventivo (35). Estes últimos podem ser considerados como fatores que dificultam o diagnóstico precoce (35). Sabe-se ainda que por meio dos exames preventivos periódicos, pode-se controlar a doença, rastreando a população sintomática e assintomática, levando, na maioria dos casos, à cura. (31, 36).

Todavia, a persistência de alguns tipos específicos de HPV é considerada como o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e câncer cervical invasor. Cerca de 95% dos cânceres do colo do útero estão associados a oito tipos de HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 (37-38). Apesar de ainda haver dúvidas na categorização de alguns tipos de HPV, sabe-se que o HPV 16 está presente em 50-75% dos carcinomas e tem forte potencial ontogênico. O HPV 18 está presente em 7-20% dos casos, também é muito importante, particularmente em adenocarcinomas (38-39).

O estadiamento do câncer do colo uterino é clínico, foi modificado pela FIGO em janeiro de 2009, como exposto na tabela 1 e o estadiamento TNM é o da sétima edição, de 2009 da UICC (*Union Internationale Contrele Cancer*) (40).

A escolha da terapia mais apropriada e a formulação do prognóstico para uma paciente com câncer são feitos com base no conhecimento clínico sobre a extensão da doença e seu comportamento biológico. Para os carcinomas cervicais, a histerectomia e a radioterapia constituem os métodos terapêuticos mais utilizados (41). Outros fatores que influencia na escolha terapêutica são: a idade da paciente, o estágio da doença, as comorbidades presentes, o desejo de engravidar, a presença

de fatores de risco alto para recorrência pós-cirúrgica e a preferência tanto do médico quanto da paciente (42).

**Tabela 1** – Estadiamento cirúrgico do câncer do colo do útero. Correspondência com a classificação TNM.

<p><b>ESTADIAMENTO DO CÂNCER DO COLO UTERINO FIGO, 2009</b></p> <p><b>Estádio I – Tumor restrito ao colo sem extensão ao corpo uterino.</b> IA Tumor invasivo somente diagnosticando por microscopiacom invasão &lt; 5mm e extensão &lt; 7mm. IA1 – Invasão estromal &lt; 3mm e extensão &lt; 7mm. IA2 – Invasão estromal entre 3 e 5mm e extensão &lt; 7mm. IB Tumor clinicamente visível limitado ao colo ou tumores pré-clínicos &gt; estágio IA. IB1 – Tumor clinicamente visível &lt; 4cm em seu maior diâmetro. IB2 – Tumor clinicamente visível &gt; 4cm em seu maior diâmetro.</p>
<p><b>Estádio II – Tumor invadindo o útero mas não a parede pélvica ou terço inferior da vagina.</b> IIA Não há invasão parametrial IIA1 – Tumor clinicamente visível &lt; 4cm em seu maior diâmetro IIA2 – Tumor clinicamente visível &gt; 4cm em seu maior diâmetro IIB Tumor com invasão parametrial</p>
<p><b>Estádio III – Tumor com extensão a parede pélvica e/ou comprometido terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante.</b> IIIA Tumor invade terço inferior da vagina sem extensão á rede pélvica IIIB Extensão á parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não funcionante</p>
<p><b>Estádio IV – Tumor estende-se além da pelve ou invade a mucosavesical ou do reto.</b> IVA Extensão a órgãos adjacentes IVB Extensão a órgãos a distância</p>

No estadiamento IA1, não havendo invasão do espaço linfovascular, o tratamento preferencial é a histerectomia simples, via abdominal ou via vaginal. Se houver interesse em preservar a fertilidade, o tratamento pode se limitar à conização, se as margens do espécime retirado estiverem livres de lesão. No estadiamento IA2 e IA1, com invasão do espaço linfovascular, o tratamento preferencial é a cirurgia radical que consiste na linfadenectomia pélvica, parametrectomia e histerectomia total com retirada de manguito vaginal. No estágio IA2, sem invasão do espaço linfovascular tem havido a tendência de redução da

radicalidade cirúrgica. Se for desejada a conservação do potencial reprodutivo, pode ser indicada a traquelectomia radical com linfadenectomia videolaparoscópica (43-45). No estadiamento IB1 e IIA1, o tratamento poderá ser cirúrgico ou radioquimioterápico. A morbidade pode ser elevada quando se associam os dois tipos de tratamento, devendo, portanto, ser evitada a associação. A cirurgia deve ser radical, podendo ser realizada por via abdominal (cirurgia de Wertheim-Meigs) ou por via vaginal (cirurgia de Schauta-Amreich). Na utilização da via vaginal a linfadenectomia poderá ser realizada por videolaparoscopia. Os ovários são conservados em pacientes na menacma. Ainda neste estágio, sendo desejada a preservação da fertilidade, pode ser indicada a traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica(43-44) .

A pesquisa de linfonodo sentinela tem sido feita ainda em fase experimental, sem estar integrada às normas assistenciais. A radioterapia externa mais braquiterapia, quando indicada, é associada à quimioterapia, com melhora da sobrevida. Nessas indicações, a radioterapia parece especialmente benéfica no adenocarcinoma e nos tumores adenoescamosos. No estadiamento IB2 e IIA2 – O tratamento preferencial é a radioquimioterapia concomitante(46). As modalidades de tratamento, tanto cirurgia primária (histerectomia radical com / sem terapia adjuvante) e radioterapia definitiva (radioterapia isolada ou radioquimioterapia concomitante) são tratamento adequado de estágio do câncer do colo do útero IB2 e IIA2. As principais complicações e taxa de repetição não são diferentes (47). A cirurgia radical com linfadenectomia muito provavelmente necessitará da radioterapia pós-operatória. Atualmente é uma opção terapêutica pouco usada atualmente. A opção da quimioterapia neoadjuvante (três cursos) seguida de cirurgia radical e posterior radioquimioterapia conta com adeptos. No estadiamento IIB, III e

IVA (câncer avançado). O tratamento padrão é a radioterapia externa com braquiterapia, associadas à quimioterapia. No estágio IVA a exenteração pélvica pode ser indicada, principalmente na presença de fístula vesical ou retal, desde que o tumor não atinja a parede pélvica (46, 48-49).

### **1.3 - O Gene TP53**

O TP53 foi o primeiro gene supressor de tumor identificado, estando situado no braço curto do cromossomo 17p13.1 (Figuras 8 e 9). Trata-se de um gene altamente conservado, apresentando homologia entre diferentes espécies, codificador de uma proteína nuclear com 53 kDa, denominada proteína 53 ou p53 (50).

A p53 é uma proteína com 393 resíduos de aminoácidos com diferentes domínios e importantes observações sobre a estrutura, conformação e função: um domínio de transativação N-terminal (TAD; aminoácido 1-40), um domínio rico em prolina (PRD; resíduos 61 - 94) adjacente à TAD com elementos de conformação importantes, um grande domínio de ligação ao DNA (DBD; resíduos 100 - 300), um domínio tetramerização (4D; resíduos 324-355) e um domínio C-terminal de base (CTD; resíduos 360-393). Também notável é a existência de um sinal de localização nuclear (L\*) entre o DBD e o 4D, e um sinal de exportação nuclear (E\*) incorporado no 4D. A sequência de aminoácidos de p53 possui várias serinas conservadas, treonina e resíduos de lisina que tem um potencial regulatório significativo. Além disso, o PRD tem mostrado ser extremamente importante na regulação da estabilidade e atividade da p53.

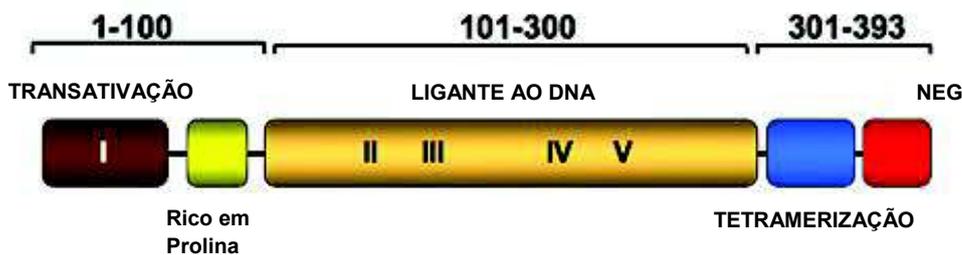
As variações genéticas no gene *TP53* são eventos que ocorrem com alguma regularidade, tendo sido descritos pelo menos 10 diferentes variantes neste gene(51). De acordo com seu papel crucial na manutenção da integridade genômica, os polimorfismos (SNPs) que afetam este gene poderão ter assim uma contribuição significativa para o desenvolvimento de determinados tumores.(52) Um dos SNPs mais estudados está localizada no exon 4 do gene TP53. Este SNP provoca uma substituição de aminoácidos de arginina (Arg) para prolina (Pro) no códon 72 de p53. Este SNP está localizado no PRD da proteína e vários estudos têm confirmado que poderia interferir com a estabilidade da proteína (53). Este polimorfismo parece conferir duas formas de p53 diferentes, estrutural e funcional. Estas evidências conduziram uma grande investigação sobre o presente papel do polimorfismo no desenvolvimento de neoplasias diferentes, tais como o câncer cervical, câncer de bexiga, câncer colorretal, câncer de mama, câncer de nasofaringe, carcinoma do ovário e adenocarcinoma de pulmão (53-54). Tem-se sugerido que os genótipos homozigóticos Arg apresenta uma susceptibilidade a degradação do p53 induzida por E6 do HPV (55).

A proteína p53 desempenha um papel central na regulação das diferentes vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos no DNA causados por diferentes agentes (p. ex., luz ultravioleta, radiação ionizante e carcinógenos químicos). Esta fosfoproteína de 53 quilodáltons é uma reguladora transcricional cuja atividade é induzida em resposta aos danos no DNA e pode levar a uma parada no ciclo celular ou induzir apoptose em resposta à depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais e oncogenes celulares ativadas. Nestas situações, a p53 estabilizada, acumula-se rapidamente, sofre modificações pós-traducionais e freia a progressão do ciclo celular nos seus pontos

de checagem para que o DNA possa ser reparado. A p53 regula a progressão da célula pelo ponto de checagem G1/S, embora existam evidências de que esta proteína também desempenhe uma função crítica na regulação da transição G2/M. Caso o dano persista, a célula é eliminada da população por apoptose (56).

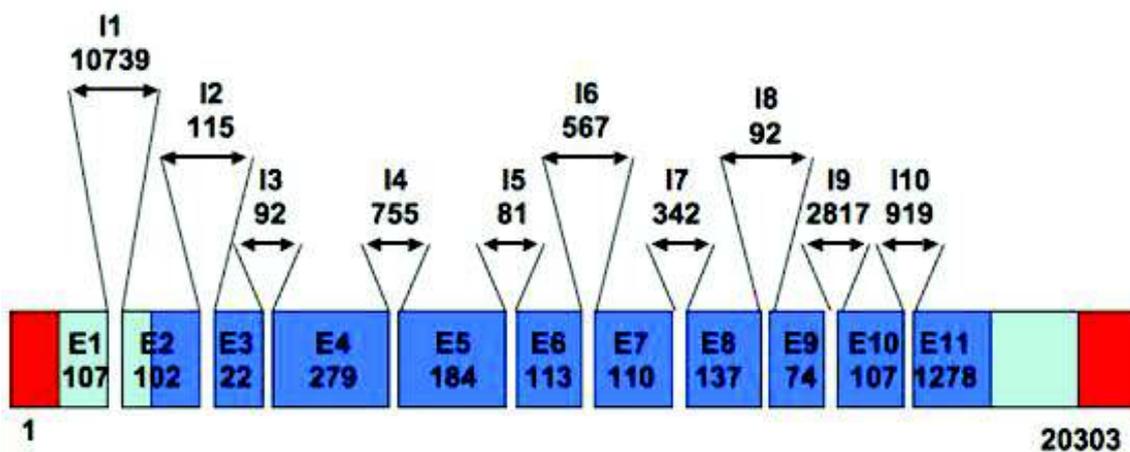
A p53, que em situações normais possui uma meia-vida muito curta, é mantida em baixos níveis nos tecidos normais que não sofreram nenhum dano. Os baixos níveis de p53 nos tecidos normais são mantidos através de mecanismos que garantem a sua rápida degradação. Através de ensaios de imuno-histoquímica pode-se detectar a p53 mutante em tumores, uma vez que esta adota uma conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem (56).

A proteína supressora de tumor p53, também chamada de “guardiã do genoma” é responsável pela estabilidade deste (Figura 7).

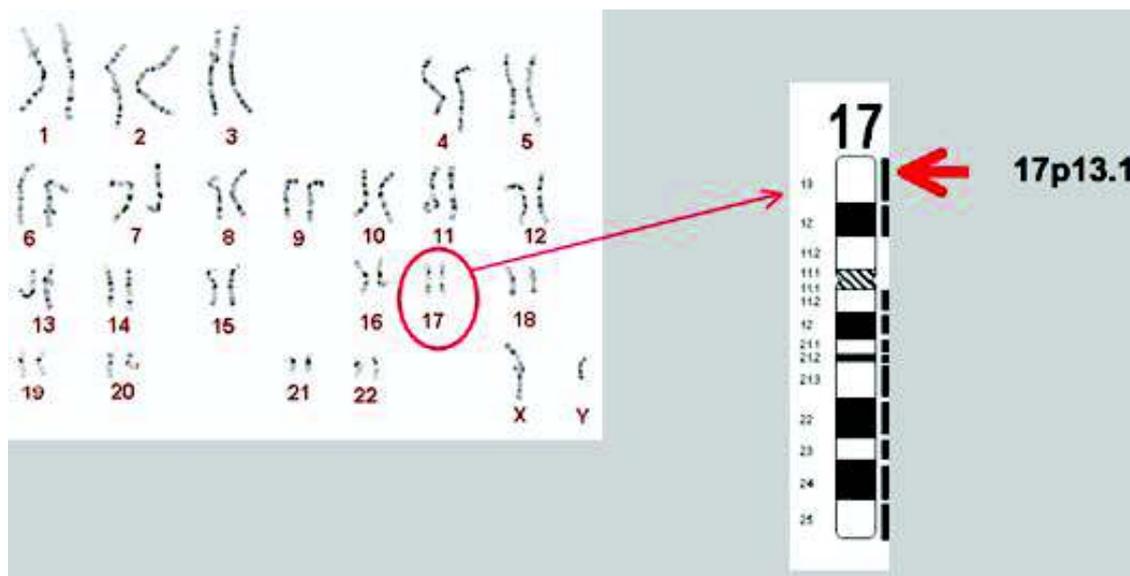


**Figura 7** - Representação esquemática da estrutura da proteína p53. Consiste de 393 resíduos de aminoácidos com 5 domínios bem definidos. O domínio de transativação, responsável pela ligação do MDM2. Um domínio rico em prolina, região altamente conservada. O domínio de ligação ao DNA. Um domínio de tetramerização, seguido por domínio básico não estruturado (Modificado do site [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_Protein.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)).

Quando o DNA é exposto à radiação ionizante este se altera. As proteínas sensoras (RAD9, RAD1, RAD17 e HUS1) reconhecem este dano e sinalizam para cinases, como a ATM, para que estas fosforilem e ativem a proteína p53. A p53 ativada atua em alvos de cascata, principalmente induzindo a transcrição do gene p21, que impede a célula de entrar na fase S, causando atraso no ciclo celular e permitindo o reparo do DNA, ou, quando o dano ao DNA está além da possibilidade de reparo, encaminha a célula para apoptose. A molécula Murine Double Minute-2 (MDM2) é uma das responsáveis pela regulação na degradação da proteína p53 através da via de ubiquitinação e também por bloqueio direto da atividade transcricional da p53 (57). Mediante este dano ao DNA, a molécula ATM pode fosforilar a p53 e o MDM2, protegendo a p53 da degradação, estabilizando-a, aumentando sua concentração e permitindo, assim, atraso no ciclo celular (58).



**Figura 8** - Representação esquemática da organização dos 11 exons (azul) do gene TP53 que possui 20303 pb. Acima estão esquematizados os íntrons. (Modificado do site [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_gene.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html)).



**Figura 9** - Localização do gene TP53 no cromossomo 17 (Disponível no site <http://p53.free.fr/p53info/p53gene.html>).

A grande maioria das mutações do gene TP53 encontradas em células neoplásicas ocorre com maior frequência no domínio de ligação do DNA, e normalmente diferem do tipo selvagem em apenas um resíduo de aminoácido. Estas proteínas mutantes são frequentemente inativas devido a sua incapacidade de se ligar ao DNA. O papel de polimorfismos de base única na susceptibilidade do câncer é considerada mais importante quando associadas com proteínas onco gênicas, tais como o E6 ou E7 de HPV (59). A proteína E6 desempenha importante papel nos processos que culminam com transformação celular neoplásica, em especial pelo fato de essa proteína interagir de maneira a acelerar os mecanismos de degradação fisiológica da proteína supressora do crescimento tumoral p53, fenômeno esse que interfere profundamente nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA (60).

Segundo Sousa et al, tipos de HPV podem interagir de modo diferente com a p53 e esta interação, pode ser mais importante se considerarmos a associação com diferentes variantes do gene TP53 (53). Assim, o polimorfismo genético de p21 e p53 é passível de modificar a resposta de tecidos normais à

radiação terapêutica (61). A concordância entre a superexpressão da proteína p53 detectado por imuno-histoquímica e a detecção da presença do gene mutado por métodos moleculares é de aproximadamente 70% (62).

Storey et al., em 1998, sugeriram que pacientes homozigóticas para o alelo Arg eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer cervical, comparadas com pacientes heterozigóticas ou homozigóticas para o alelo Pro, concluindo por tanto, que este polimorfismo de base única (SNP) poderia estar envolvido na carcinogênese do colo uterino. Sugerindo que a proteína contendo um resíduo de arginina é significativamente mais susceptível à degradação mediada pela proteína E6 dos HPV de alto-risco do que a proteína contendo um resíduo de prolina, revelando assim uma associação positiva entre este polimorfismo e o desenvolvimento de câncer do colo do útero (63). Porém, o papel deste polimorfismo é ainda alvo de controvérsia, desde que estudos mais recentes não demonstraram esta associação (53, 64-65).

A maioria dos estudos tem focado na associação destes polimorfismos com susceptibilidade ao câncer, mas, a despeito de fortes hipóteses, a associação entre eles e o desenvolvimento de reação de tecido normal à radioterapia tem sido pouco investigado (61).

#### **1.4 - Radiossensibilidade**

O emprego de radioterapia no tratamento das neoplasias do colo uterino data do início de século XX, e os progressos tecnológicos no conhecimento biológico e na integração multidisciplinar têm promovido melhora progressiva nas taxas de controle e de sobrevida (66).

Consideráveis esforços técnicos têm sido tomados para melhorar a dose tumoral efetiva e para reduzir a quantidade de tecido normal incluído inevitavelmente no volume de tratamento da radiação. Enquanto hoje a maioria dos pacientes tolera bem a terapia por radiação convencional, os clínicos ainda observam uma quantidade substancial de pacientes (em torno de 10%) que sofrem de efeitos adversos severos decorrentes de sensibilidade intrínseca do tecido normal (67). Existe a constatação clínica de que a severidade das reações em tecido normal, após radioterapia, variam consideravelmente em cada paciente. Uma variedade de fatores do paciente, do tumor, celulares, moleculares e do tratamento contribuem para esta variabilidade de resposta. Apesar de todos estes fatores, parece provável que diferenças biológicas mais profundas na resposta individual à radiação contribuam para a variabilidade na radiosensibilidade clínica (68).

Talvez a mais convincente evidência em favor da hipótese de que radiosensibilidade clínica pode ser afetada por alterações genéticas venha de estudos de pacientes com certas síndromes genéticas raras tais como ataxia-telangiectasia, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom. Todas estas síndromes, entre outras, exibem radiosensibilidade clínica e estão relacionadas a mutações germinativas em genes envolvidos na detecção e reparo de DNA danificado (69). Contudo, estas síndromes radiosensíveis, caracterizadas por herança mendeliana, são raras e provavelmente de pequena relevância quando endereçadas a radiosensibilidade entre pacientes oncológicos aleatórios (68). Mutações em genes de reparo têm também sido detectadas em pacientes oncológicos extremamente radiosensíveis, sem sofrer de nenhuma síndrome (70).

A radiosensibilidade seria sugerida como uma característica complexa e poligênica resultante de uma interação de um número de genes em vias celulares

diferentes (71), onde o maior desafio seria identificar a combinação de variantes genéticas múltiplas de baixa penetrância (SNPs) que afetam o complexo fenótipo celular e clínico e podem, por conseguinte ser úteis como potenciais biomarcadores para prever resposta do tecido normal após radioterapia (72). Para calcular a dose biológica efetiva (BED) nos órgãos de risco no planejamento de colo de útero, bexiga e reto, na resposta aguda, foi utilizada a relação  $\alpha/\beta = 3.0$  Gy. O cálculo do BED total foi obtido com a soma do BED da teleterapia mais o BED da braquiterapia (73-74). Aplicando a seguinte fórmula:

$$BED = n.d(1+d / \alpha/\beta)$$

Onde:

n = número de aplicações de radioterapia em dias

d = dose total de radioterapia/dia

$\alpha/\beta$  = dose na qual os componentes linear e quadrático da morte celular são iguais

Os efeitos tóxicos do tratamento adjuvante foram avaliados através de escalas de morbidades aguda e tardia, elaboradas pelo Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (75-76) (Tabela 2).

**Tabela 2-** Escala de toxicidade aguda do RTGO (modificado)

	<b>Grau ( 0 )</b>	<b>Grau ( 1 )</b>	<b>Grau (2)</b>	<b>Grau ( 3 )</b>	<b>Grau ( 4 )</b>
<b>TGI</b>	Sem alterações	Alteração do hábito intestinal ou desconforto retal sem não requerendo medicação	Diarreia ou desconforto retal requerendo medicação, eliminação de muco	Diarreia requerendo suporte parenteral, eliminação persistente de muco ou sangue, distensão abdominal	Obstrução aguda ou subaguda, fístula ou perfuração ou sangramento do TGI, requerendo transfusão ou intervenção cirúrgica
<b>TGU</b>	Sem alterações	Frequência urinária aumentada ou noctúria, disúria, urgência não requerendo medicação	Frequência urinária ou noctúria quase horária, disúria requerendo medicação	Frequência urinária ou noctúria horária, disúria, urgência requerendo medicação frequente, hematúria macroscópica	Hematúria requerendo transfusão, Obstrução vesical aguda, ulceração ou necrose

TGI = Trato gastrointestinal; TGU = Trato Genitourinário

## **2 - OBJETIVOS**

---

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

1. Investigar os genótipos de HPV nas amostras de pacientes com câncer de colo uterino.
  2. Avaliar a frequência do polimorfismo do fragmento Arg72Pro do gene TP53 nas amostras coletadas.
  3. Identificar ou não uma associação entre a positividade do HPV e/ou polimorfismo do fragmento Arg72Pro do gene TP53 com as características clínicas, radiosensibilidade e o prognóstico da paciente.
-

### 3 - METODOLOGIA

---

#### 3.1 - Seleção de pacientes

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, sob o número 12/2010. Vinte e sete pacientes, foram selecionadas, conforme critérios de inclusão (anexo 1), portadoras de câncer do colo uterino, com estadiamento clínico entre Ib a IIIb, que aceitaram assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), e que se submeteram à radioterapia no Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). Foi coletado amostras citológicas em células descamativas da cérvix previamente ao início da radioterapia. O material para a detecção e genotipagem do HPV e o sequenciamento do TP53 foi extraído por raspado com *citobrush* em meio preservativo (*Universal Collection Medium- DIGENE*) e armazenada em freezer a -20°C até a extração do DNA.

As informações clínicas das pacientes foram coletadas por questionário (Anexo 3), das fichas de tratamento radioterápico por teleterapia, braquiterapia e dos prontuários. Os efeitos tóxicos do tratamento adjuvante foram avaliados através de escalas de morbidades aguda, elaboradas pelo RTOG (75-76) (Tabela 2).

#### 3.2 Extração de DNA

A extração de DNA a partir da amostra citológica líquida coletada de cada paciente foi realizada com equipamento e a tecnologia desenvolvidos pela Invitrogen

Corporation, CA. O kit *iPrep™ PureLink™ gDNA Blood* possui a tecnologia das *Dynabeads® MyOne™ SILANE* que são esferas magnéticas monodispersas (1 µm) com uma superfície tipo sílica e uma área de superfície específica. A purificação do DNA da amostra foi obtida utilizando o procedimento de purificação baseado em esferas, evita o uso de centrífugas e sistemas a vácuo, além de extrair 13 amostras em 30 minutos. No processo totalmente automatizado, as células foram lisadas com o *Lysis Buffer* e as proteínas digeridas com proteinase K. O lisado foi misturado com *Dynabeads® MyOne™ SILANE* para subsequente ligação do DNA da amostra. O DNA ligado às esferas magnéticas foi separado do lisado utilizando separação magnética. As esferas foram lavadas com os tampões de lavagem para remoção dos contaminantes. O DNA genômico foi então eluído com tampão de eluição.

A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% e fotodocumentado pelo *Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories INC Latin America)*.

### **3.3 - Amplificação do DNA e Genotipagem do HPV**

O ensaio baseia-se na amplificação por PCR de um fragmento de 450pb de região L1 de HPV, utilizando os iniciadores PGMY09/MY11, biotinilados. Posteriormente ocorre a etapa de hibridização, na qual o produto de PCR amplificado, hibridiza-se às sondas específicas de lavagem para remoção de material não ligado e a detecção colorimétrica(77-78). Utilizado para a genotipagem do HPV anogenital, a hibridização reversa "Line Blot" - Kit da Roche® - Roche Linear Array(LA), conforme metodologia descrita em Gravitt e Cols (79). É um teste qualitativo *in vitro* para detecção e genotipagem do Vírus do Papiloma Humano em

amostras clínicas, no qual detecta trinta e sete genótipos de DNA anogenital [6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82(MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 e CP6108] de HPV em células cervicais colhidas em solução (77). (protocolo de execução em Anexo 4).

### 3.4 - Amplificação das regiões de TP53 e sequenciamento

O SNP do códon 72 do gene TP53 ocorre no segundo nucleotídeo do códon e este se localiza na posição 466 do mRNA (2640nt). Para amplificação da região de interesse do gene TP53 (NM\_000546) definimos um par de oligonucleotídeos. Deste modo, foi utilizado como *primer sense* a sequência 5' - ATGGAGGAGCCGCGATCAGA - 3' (posição 10953-10972) e como *primer antisense* 5'- TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC - 3' (posição 11006-11025), gerando um fragmento de PCR de 527 pares de base (pb).

Os fragmentos de 527 bp então gerados a partir do DNA adicionado com uma *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA), a qual contém em sua mistura o tampão para PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, EUA). Esta amplificação realizou-se com 1 ciclo de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95° C por 30 segundos, 61,3° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto. Por fim, uma etapa de extensão final de 72° C por 10 minutos, sendo que após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C até o congelamento ou à eletroforese. Para avaliação dos amplicons, os mesmos foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose à 0,8%. As reações de PCR foram primeiramente submetidas à purificação pelo kit de purificação da Invitrogen™ e tratadas com o reagente ExoSAP-IT (Invitrogen, CA) para remover os dideoxynucleotídeos trifosfato (ddNTPs) e primers que restaram da reação de PCR. Após a purificação, os fragmentos de interesse foram quantificados utilizando o bioanalisador de DNA Nanodrop (ThermoScientific, USA), para adequação da concentração de DNA de acordo com a exigência do Kit de sequenciamento.

Para a reação de sequenciamento foram definidos oligonucleotídeos interno sense. Para o gene TP53 foi utilizado o primer interno com a seguinte sequência: 5' - ATGGGACTGACTTTCTGCT - 3'. O kit de seqüenciamento usado nas reações foi o BigDye Terminator v. 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), que fornece os componentes necessários para reação de sequenciamento em uma pré-mistura pronta, que foi adicionada juntamente com o produto de PCR purificado e primer. A reação de sequenciamento foi realizada com 1 ciclo de desnaturação a 96° C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 55,3°C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos. Após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C.

Antes da eletroforese capilar as amostras foram submetidas à purificação utilizando o Kit de purificação BigDye Xterminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) para remoção completa de ddNTPs, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, as amostras analisadas foram submetidas à eletroforese capilar no bioanalisador de DNA, ABI 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando polímero POP-7 para ABI 3130 e 3130xL (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados obtidos foram analisados pelo Software Seqscape v. 2.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 3.5 - Análise Estatística

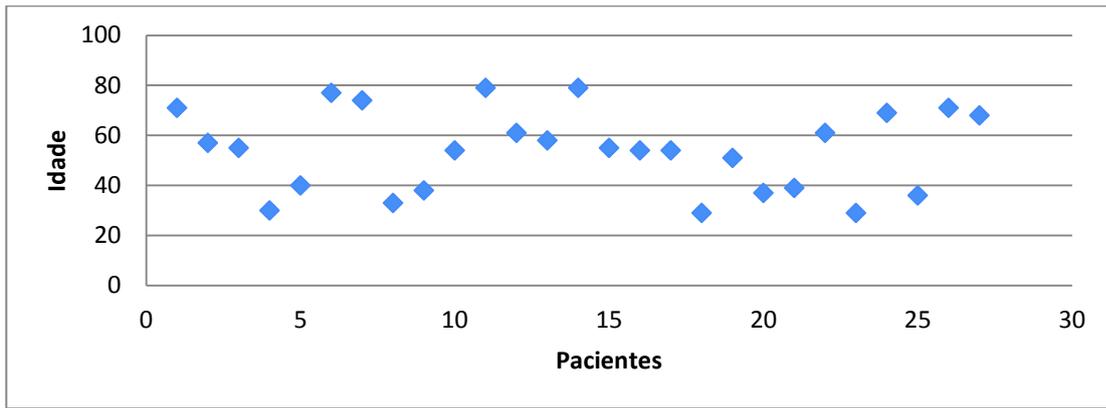
As análises foram realizadas com o pacote de software estatístico SigmaStat versão 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Após coleta dos dados em formulário pré-testado, foi realizada a caracterização da amostra por meio de cálculos de medida de dispersão e tendência central. As variáveis foram testadas para verificação de possíveis associações por meio dos testes Tt de *student* para variáveis contínuas paramétricas ou Mann Whitney quando estas não tinham distribuição normal. Para as variáveis categóricas foram utilizados teste do chi-quadrado ( $X^2$ ), com correção pelo teste de Yates ou o teste exato de Fisher, e análise do risco relativo para estimar as possíveis associações. Todas as análises foram realizadas com o  $\alpha$  de 5% e intervalo de confiança de 95%. E risco relativo com intervalo de confiança de 95%.

## **4 - RESULTADOS**

---

### **4.1 - Características Clínicas**

Foram selecionadas 27 pacientes que preencheram os critérios de inclusão do estudo ( anexo 1). A média de idade do grupo foi de  $54,0 \pm 16,3$  anos (variando de 29 a 79 anos) (Figura 10). A média de gestações  $5,8 \pm 3,6$  (variando de 0 a 16 gestações), a média de partos foi  $5,2 \pm 3,2$  (variando de 0 a 15 partos). A presença de comorbidades (hipertensão arterial sistêmica (HAS) e/ ou diabetes) foi observado em 10 (37,04%) pacientes. O tabagismo em 11 (40%) pacientes. O estadiamento IB1 em uma (3,7%) paciente; IB2 em seis (22%) pacientes; IIA em duas (7,4%) pacientes; IIB em 17 (63%) pacientes e IIIB em uma (3,7%) paciente. O tipo histológico carcinoma espinocelular foi encontrado em 25 (92,6%) pacientes e adenocarcinoma em duas ( 7,4% ) pacientes. O grau de diferenciação histológica diferenciado em duas (7,4%) pacientes; moderadamente diferenciado em 13 (48%) pacientes; indiferenciado em cinco (18,5%) e não especificado (SOE) em sete (25,9%). Resposta ao tratamento das 27 pacientes, quatro (14,8%) foram excluídas por abandono, 16 (59,3%) com remissão total da doença, sete (25,9%) com doença em atividade/óbito (Tabela 3).



**Figura 10** - Distribuição de casos de câncer de colo uterino conforme idade.

**Tabela 3 - Características clínicas**

Variável	Número de pacientes
Número de pacientes	27
Média de idade (anos)	54,0 ± 16,3
Paridade	5,2 ± 3,2
HAS n(%)	
Sim	8 (29,6)
Não	19 (70,4)
Diabete n(%)	
Sim	5 (18,5)
Não	22 (81,5)
Tabagismo n(%)	
Sim	11 (40,7)
Não	16 (59,3)
Histologia n(%)	
CEC	25 (92,6)
Adeno	2 (7,4)
Grau de diferenciação n(%)	
SOE	7 (25,9)
Diferenciado	2 (7,4)
Moderado	13 (48,1)
Indiferenciado	5 (18,5)
Estagio clínico n(%)	
Ib-1	1 (3,7)
Ib-2	6 (22,2)
IIa	2 (7,4)
IIb	17 (63,0)
IIIb	1 (3,7)
Resposta pós tratamento n(%)*	
Remissão total da doença	16(59,3)
Doença em atividade/óbito	7(25,9)
Abandono de tratamento	4(14,8)

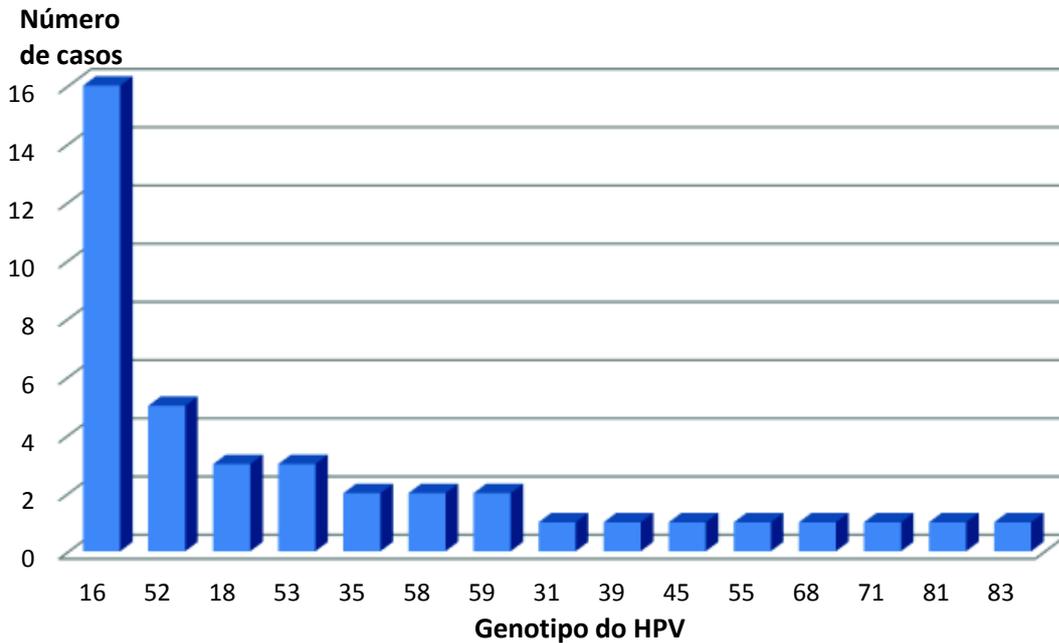
HAS(hipertensão);Adeno (Adenocarcinoma);SOE(sem origem especificada)

## 4.2 - Frequência de HPV na amostra estudada

A presença do genoma HPV foi observada em 26/27 (96,3%) pacientes, sendo 25/26 (96,2%) com vírus de alto risco e uma (3,8%) paciente com HPV de risco indeterminado. Foram encontrados 15 sorotipos de HPV (16, 18, 31, 35, 39, 45, 52, 53, 55, 58, 59, 68, 71, 81, 83), não houve a presença de HPV de baixo risco em nenhuma das pacientes da amostra. O genótipo do HPV mais prevalente foi HPV 16 (61,5%), seguido pelo HPV 52 (19,2%) e HPV 18 (11,5%) (Figura 11). A infecção por um único tipo de HPV foi observada em 19 (73,1%) pacientes e sete (26,9%) apresentavam mais de um genótipo de HPV. Não houve correlação entre HPV 16 o tipo histológico (dois(7,4%) casos de adenocarcinoma e 14(53,8%) casos com CEC), a presença de mutação no gene TP 53 e na resposta pós tratamento (Tabela 4).

**Tabela 4** Distribuição dos tipos de HPV da amostra

Tipos de HPV	Número de casos
16	11 ( 43,3%)
18	02 ( 7,7 % )
52	02 ( 7,7% )
31	01 ( 3,8% )
45	01 ( 3,8% )
71	01 ( 3,8% )
59	01 ( 3,8% )
16;53	01 ( 3,8% )
16;35;59	01 ( 3,8% )
16;39;53;68	01 ( 3,8% )
16;53;55;81	01 ( 3,8% )
16;18;52;58;83	01 ( 3,8% )
52;35	01 ( 3,8% )
52;58	01 ( 3,8% )



**Figura 11-** Prevalência dos genótipos de HPV na amostra estudada.

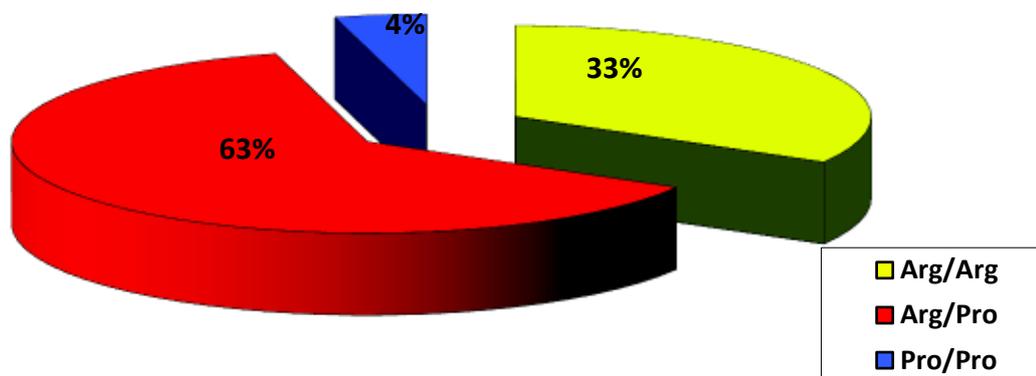
**Tabela 5 -** Associação com HPV 16

Variável	HPV 16	Outros tipos de HPV	Valor de p
Média de idade e dp (anos)	51,5 (± 14,8)	57,5 (± 19,1)	0,46
TP53 n(%)			
Arg/Pro ou Pro/Pro	11 ( 47,8)	5 ( 21,7)	0,47
Arg/Arg	4 (17,4 )	3 ( 13)	
Tipo Histológico n(%)			
CEC	14 (53,8)	10 (38,5)	0,37
ADENO	2 ( 7,7)	0	
Resposta ao tto n(%)			
Sim	8 (33,3)	8 (33,3)	0,46
Não	6 (25)	2 (8,3)	

dp = desvio padrão; CEC = Carcinoma espinocelular; ADENO = Adenocarcinoma; tto= Tratamento; Arg/Arg = TP53 selvagem; Arg/Pro ou Pro/Pro = TP53 polimórfico.

### 4.3 - Análise do polimorfismo Arg 72 Pro (R72P)

A análise do sequenciamento do fragmento Arg72Pro foi realizada em 24/27 (88,9%) pacientes. A presença do genótipo Arg/Arg em oito (33,3%), Arg/Pro em 15 (62,5%) e Pro/Pro em uma (4,2%) (Figura 12). As pacientes com a presença do genótipo selvagem Arg/Arg, apresentaram maior risco de ter infecção por múltiplos vírus (RR= 1,77; 1,15-2,73;  $p=0,04$ ). Não houve correlação quando comparamos a presença de polimorfismo fragmento Arg72Pro com infecção por HPV 16, infecção por HPV 16/18, idade, estadiamento clínico, histologia do tumor, grau de diferenciação histológica tumoral e resposta após tratamento (Figura 13, Tabela 5).

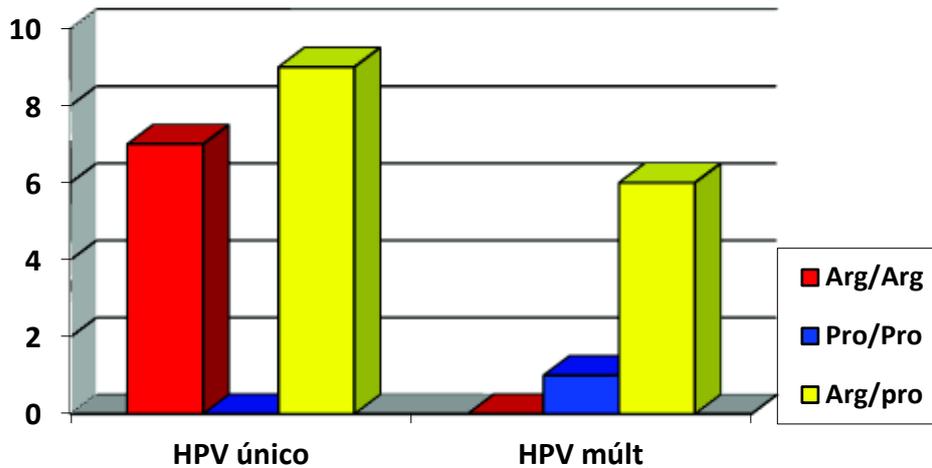


**Figura 12** - Distribuição dos genótipos do fragmento do codon 72 do gene Tp53

**Tabela 6 - Associação dos subtipos de HPV com os genótipos TP53**

Variável	TP53 Mutado (Arg/Pro ou Pro/Pro)	TP53 Selvagem (Arg/Arg)	Valor de p
Média de idade e dp(anos)	57,5 ±19,1	51,5±14,9	0,46
Infecção HPV n(%)			
único tipo	9 (39,6)	7 (30,4)	0,04*
múltiplos tipos	7 (30,4)	0	
Infecção HPV n(%)			
HPV16 sim	11 (47,8)	4 (17,4)	0,47
HPV 16 não	5 (21,7)	3 (13)	
Infecção HPV n(%)			
HPV16/18 sim	12 (52,2)	6 (26)	0,51
HPV 16/18 não	4 (17,4)	1 (4,4)	
Idade			
≤ 50 anos	6 (25)	2 (8,3)	0,50
> 50 anos	10 (41,7)	6 (25)	
Estadiamento n(%)			
IB1	1 (4,2)	0	0,47
IB2	5 (20,8)	1 (4,2)	
IIA	0	2 (8,3)	
IIB	10 (41,7)	5 (20,8)	
Histologia do tumor n(%)			
CEC	15 (62,5)	8 (33,3)	0,7
ADENO	1 (4,2)	0	
Grau de diferenciação n(%)			
G1	1 (5,5)	1 (5,5)	0,64
G2/3	10 (55,5)	6 (33,3)	
Resposta ao tto n(%)			
Cura	10 (47,6)	4 (19)	0,7
Doença residual	5 (23,8)	2 (9,5)	

dp= desvio padrão;CEC= Carcinoma espinocelular; ADENO= Adenocarcinoma; tto= Tratamento



**Figura 13** - Relação entre HPV único ou múltiplo e do fragmento Arg72pro do Tp53

#### 4.4 - Associações com a Radioterapia

Das 27 pacientes encaminhadas a radioterapia, para tratamento do câncer de colo uterino, quatro (14,8%) abandonaram o tratamento e uma (3,7%) faleceu. As 22/27 (81,5%) pacientes restantes realizaram radioterapia externa (teleterapia), dessas 21 (95,5%) receberam doses que variam entre 45-50 Gy, e uma (4,5%) paciente recebeu dose abaixo de 45Gy (em que devemos desconsiderar a dose equivalente, a qual foi considerado no momento de cálculo de BED de teleterapia, visto que, a paciente recebeu três frações de 4Gy, no caráter anti-hemorrágico). Os fracionamentos em 18 (81,8%) pacientes foi de 1,8GY e em quatro (18,2%) pacientes com 20Gy, em quatro campos diários 5 vezes por semana. O reforço parametrial foi utilizado em 14 (63,6%) pacientes com doses de 14-16Gy em 2 campos. A braquiterapia em altas doses (HDR) foi indicada para 17 (77,3%) pacientes, das quais 15 (88,2%) pacientes realizaram o fracionamento de quatro

vezes 7Gy, com dose total de 28Gy, uma (5,9%) paciente o fracionamento foi de duas vezes de 7Gy e duas vezes 6,5Gy com dose total de 27Gy e outra (5,9%) realizou somente uma dose de 7Gy, não completando o esquema terapêutico por doença residual. Todas as 22 (81,5%) pacientes realizaram quimioterapia neoadjuvantes (cisplatina na dose de 40mg/m<sup>2</sup> por quatro ciclos semanais). Na avaliação da dose biológica efetiva (BED) nos órgãos de risco, a dose média do BED no trato geniturinário (TGU) foi 91,01Gy ( $\pm 16,7$ Gy) variando de 72 a 127,18Gy e no trato gastrointestinal (TGI) foi 103,4Gy ( $\pm 18$ Gy) variando de 72 a 123Gy (Figura 14).

Para análise do grau de toxicidade aguda dividimos os pacientes em dois grupos, conforme RTOG, um com grau de toxicidade 0-1 e outro com grau  $\geq 2$ . A presença de toxicidade aguda (grau 0-1 ou  $\geq 2$ ) no TGI foi observada em 11 (50%) pacientes, sendo grau 0-1 em 16 (72,7%) e grau  $\geq 2$  em seis (27,3%). A média de idade das pacientes que apresentaram toxicidade grau  $\geq 2$  foi significativamente maior que aquelas com toxicidade grau 0-1 ( $67,3 \pm 8,9$  anos e  $48,4 \pm 16,9$  anos respectivamente,  $p= 0,02$ ). As pacientes com idade  $\geq 50$  anos apresentaram risco 1,8 (1,1 a 2,8) vezes maior de toxicidade  $\geq 2$  ( $p= 0,04$ ). A presença de múltiplos tipos de HPV se correlacionou com maior probabilidade de toxicidade de grau  $\geq 2$  (66,7% versus 13,3%,  $p= 0,03$ ). No grupo de pacientes com grau 0-1 de toxicidade no TGI a média do BED total foi  $102,7 \pm 18,9$  Gy, no grupo  $\geq 2$  a média do BED total foi  $105,3 \pm 16,7$  Gy ( $p=0,74$ ) (figura 14). Também não houve correlação entre toxicidade do TGI e HAS, diabete, tabagismo, polimorfismo no TP53 e resposta ao tratamento (Tabela 6).

A toxicidade aguda no TGU ocorreu em cinco (22,7%) pacientes, sendo grau 0-1 em 19 (86,4%) com a média do BED total no grupo 0-1 foi  $91,1 \pm 16,8$  Gy e

no grupo com grau  $\geq 2$  em três (13,6%), a média do BED total foi  $90,5 \pm 20,1\text{Gy}$  ( $p=0,9$ ) (Figuras 14 e 15). Não houve correlação entre toxicidade do TGU e idade das pacientes, HAS, diabete, tabagismo, polimorfismo TP53, HPV e resposta ao tratamento (Tabela 7).

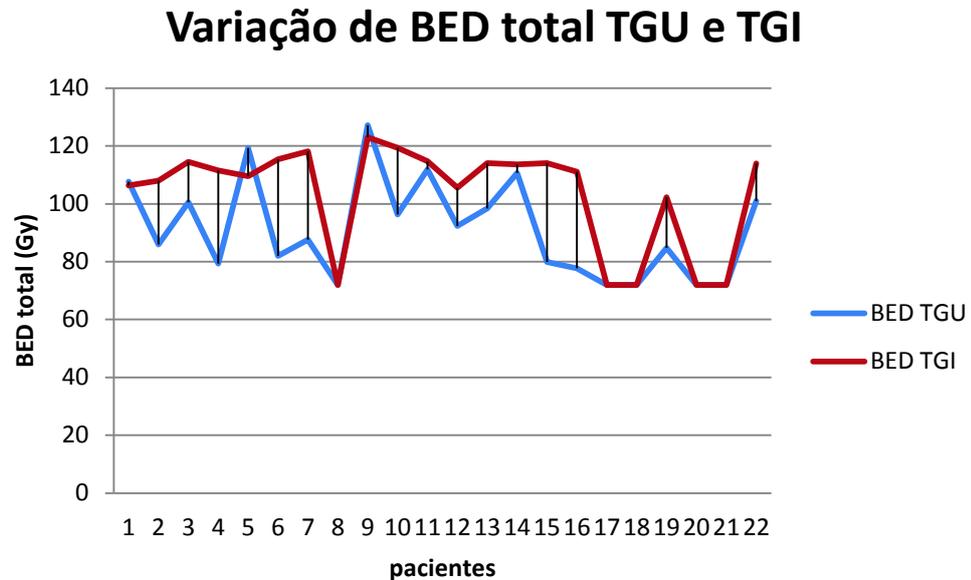


Figura 14 - Variação de BED total em TGU e TGI

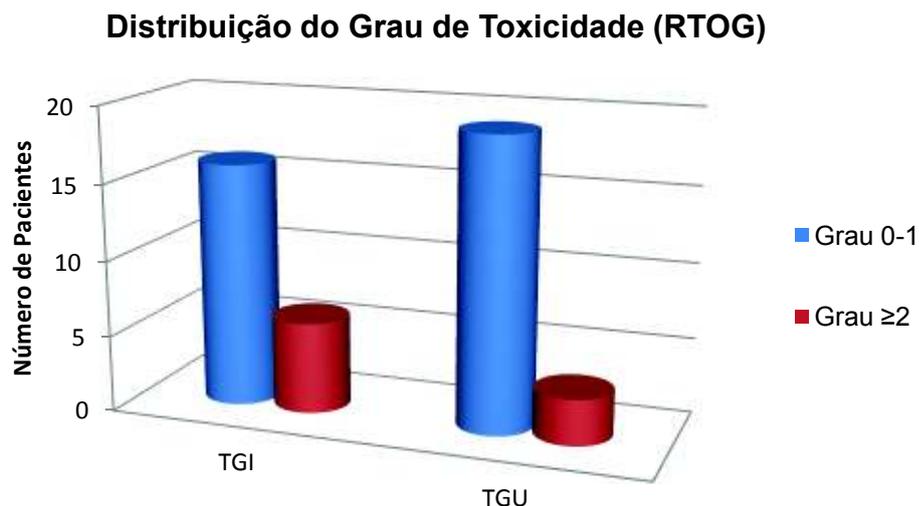


Figura 15 - Distribuição do grau de Toxicidade conforme RTOG no trato gastrointestinal (TGI) e no trato genitourinário (TGU) da amostra.

**Tabela 7 - Associação com toxicidade do trato gastrointestinal conforme RTOG**

Variável	RTOG-TGI		Valor do p
	Grau 0 - 1	Grau $\geq$ 2	
N (%)	16 (72,7)	6 (27,3)	
Média de idade (anos)	48,4 $\pm$ 16,9	67,3 $\pm$ 8,9	0,02†
Idade (anos)			
< 50	8 (36,4)	0 (0,0)	0,04‡
$\geq$ 50	8 (36,4)	6 (27,3)	
HAS n (%)			
Sim	5 (22,7)	2 (9,1)	0,6‡
Não	11 (50,0)	4 (18,2)	
Diabete n (%)			
Sim	4 (18,2)	0 (0,0)	0,2‡
Não	12 (54,5)	6 (27,3)	
Tabagismo n (%)			
Sim	5 (22,7)	4 (18,2)	0,1‡
Não	11 (50,0)	2 (9,1)	
BED total	102,7 $\pm$ 19,0	105,3 $\pm$ 16,7	0,7†
TP53 n (%)*			
Arg/Arg	5 (25,0)	1 (5,0)	0,4‡
Arg/Pro ou Pro/Pro	9 (45,0)	5 (25,0)	
HPV n (%)**			
Único	13 (61,9)	2 (9,5)	0,03‡
Múltiplos	2 (9,5)	4 (19,1)	
Remissão total da doença n (%)			
Sim	11 (50,0)	5 (22,7)	0,4‡
Não	5 (22,7)	1 (4,5)	

\* n=20; \*\* n=21; TP53 selvagem = Arg/Arg; TP53 mutado = Arg/Pro ou Pro/Pro; ‡ teste exato de Fisher; † teste t de Student.

**Tabela 8 - Associação da toxicidade do trato genitourinário conforme RTOG**

Variável	RTOG-TGU		Valor do p
	Grau 0 -1	Grau ≥ 2	
N (%)	19 (86,4)	3 (13,6)	
Média de idade (anos)	53,6 ± 17,6	53,3 ± 18,5	0,9
Idade (anos)			
< 50	7 (31,8)	1 (4,5)	0,7
≥ 50	12 (54,5)	2 (9,1)	
HAS n (%)			
Sim	7 (31,8)	0 (0,0)	0,2
Não	12 (54,5)	3 (13,6)	
Diabete n (%)			
Sim	3 (13,6)	1 (4,5)	0,4
Não	16 (72,7)	2 (9,1)	
Tabagismo n (%)			
Sim	8 (36,4)	1 (4,5)	0,6
Não	11 (50,0)	2 (9,1)	
BED total	91,1 ± 16,8	90,5 ± 20,1	0,9
TP53 n (%)*			
Arg/Arg	5 (25,0)	1 (5,0)	0,7
Pro/Pro ou Arg/Pro	12 (60,0)	2 (10,0)	
HPV n (%)**			
Único	14 (66,7)	1 (4,8)	0,1
Múltiplos	4 (19,1)	2 (9,5)	
Remissão total da doença n (%)			
Sim	14 (63,6)	2 (9,1)	0,6
Não	5 (22,7)	1 (4,5)	

\* n=20; \*\* n=21; TP53 selvagem = Arg/Arg; TP53 mutado = Arg/Pro ou Pro/Pro.

## 5 - DISCUSSÃO

---

Embora o HPV seja o agente final da relação causal do câncer de colo uterino, existem outros fatores, como os relacionados ao estilo de vida, que são importantes na permissão da ação deste vírus no nosso meio e que não acontecem nas regiões mais desenvolvida como a grande dificuldade ao acesso a saúde e a prevenção de outras doenças sexualmente transmissíveis. Vários estudos apontam a realização do exame citopatológico cervical como de grande importância na identificação de lesões pré-invasivas, portanto, bloqueando a ocorrência do câncer que só seja diagnosticado tardiamente (32, 80) (81). Estudos relatam risco aumentado nas mulheres que tiveram grande número de gestações e partos (80, 82). Neste estudo as mulheres do grupo casos tiveram  $5,8 \pm 3,6$  gestações e  $5,2 \pm 3,2$  partos. No trabalho de Murta (1999) (83) foi observado que a maioria das mulheres com câncer de colo uterino apresentou mais que quatro gestações ou partos, entretanto, notaram que estes números estão decaindo. Essa diminuição da paridade, nas pacientes com câncer do colo uterino os levou a questionar se a multiparidade pode ser ainda imputada como fator de risco ou se este maior número de gestações e partos decorre do menor nível socioeconômico (83). Porém quando separado os grupos com referência ao número de gestações até cinco gestações e mais de cinco gestações, obteve-se diferença significativa (80).

A faixa etária de maior ocorrência do câncer de colo uterino é de 40 a 60 anos, 10 a 15 anos após a idade de maior frequência das lesões pré-invasivas. A média de idade encontrada no grupo foi de  $54 \pm 16$  anos, esta média está dentro da faixa etária relatada na literatura (32, 80, 82).

O tabagismo é apresentado como um importante fator de risco por diminuir a imunidade local (84-86). Em nosso estudo foi observado que 59,7% das pacientes eram não fumantes, não houve diferença estatística no hábito de fumar entre os grupos quando comparadas a resposta terapêutica ( $p = 0,12$ ), concordando com os dados encontrados no estudo de Lima et al., 2006 (80), que não encontrou diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes com câncer de colo uterino fumante e não fumante e grupo controle (80).

Uma vez que, as pacientes deste trabalho foram selecionadas quando encaminhadas ao serviço de radioterapia, todas apresentavam câncer invasor e, destes, 74,1% apresentavam-se em estágio II ou III (localmente avançada) o que denota o diagnóstico tardio. Certamente, há muitos fatores que contribuem para esse cenário, mas três aspectos podem ajudar a compreender melhor o problema e merecem destaque: a pouca cobertura do exame Papanicolaou, sua acurácia e o difícil acesso aos serviços de saúde, revelando, sobretudo, carência de centros de oncologia fora das grandes capitais do país (33, 80, 87).

A resposta após dois meses do término da radioterapia associada a quimioterapia foi 59,3% com remissão completa da doença, 22,2% com doença em atividade e 3,7% de óbito (óbito / doença em atividade total 25,9%). Estes resultados também foram relatados por vários autores, que partir dos resultados de estudos prospectivos e randomizados, utilizando quimioterapia concomitante com radioterapia, evidenciou-se que existe definitivamente lugar de destaque para a QT no tratamento dos tumores do colo uterino, melhorando a resposta terapêuticas das pacientes (88-90).

A prevalência do HPV no estudo foi de 96,2% e 15 genótipos foram detectados entre os 37 analisados. Múltiplas infecções por HPV foram observadas

entre 26,9% das mulheres. Coinfecção do colo do útero com mais de um genótipo de HPV é comum, especialmente entre mulheres jovens (91).

Observamos a presença do HPV 16 em 16/26 (61,5%) das pacientes, o segundo sorotipo mais prevalente foi o HPV 52 em 5/26 (19,2%) pacientes, e terceiro foi o HPV 18, observado em 3/26 (11,5%). Não obtivemos nenhum caso de HPV 33, apesar deste genótipo ter sido o segundo mais prevalente em um estudo em nosso meio (92). Outros trabalhos confirmam nossos achados em relação a alta prevalência do HPV16 nos cânceres cervicais invasivos nas regiões Sul, Centro-Oeste, Nordeste, Norte e Sudeste, com prevalências de 52%, 57%, 59%, 43,5% e 52%, respectivamente (6, 92-96). O HPV com genótipo 16 é o mais importante agente etiológico de câncer cervical, ocorrendo globalmente em 50-60% dos casos, também é o HPV mais comum em lesões precursoras de câncer cervical, bem como em mulheres com citologia normal (97-98). Uma meta-análise, avaliando 14 estudos japoneses, revelou que os tipos de alto risco, considerados cancerígenos ou provavelmente carcinogênicos, foram os subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 52, e 58 (99). Munoz et al., 2004 relataram que o HPV 16 e 18 foram associados com 73,5% dos cânceres cervical invasor no sudeste da Ásia, 76,9% no Norte de África, e 71,5% na Europa / América do Norte e os HPV 52 e 58 foram detectadas em 6,1% dos casos dos cânceres cervical invasor no sudeste da Ásia, 1,5% no Norte de África, e 1,1% na Europa / América do Norte (100). Entretanto, em outro estudo japonês (91), os HPV 16 e 18, comparativamente, foram menos frequentemente identificados (58,8%) e os HPV 52 e 58 foram observados em 13,7% em lesões cervicais (91). Assim, devemos considerar que há uma grande variação na distribuição geográfica dos tipo de HPV.

Estudos recentes revelaram que pelo menos 13 tipos de HPV, incluindo os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são comumente associados com câncer cervical invasor (100-101). Enquanto o HPV 16 é o tipo mais prevalente em todo o mundo, tem sido relatado que a frequência de outros tipos de HPV de alto risco variam por região (102). Em nosso estudo, observamos a presença de 15 tipos de HPV (16, 18, 31, 35, 39, 45, 52, 53, 55, 58, 59, 68, 71, 82, 83), nossos dados sugerem que uma vacina visando genótipos de HPV 16, 18, 31, e 45, poderia ajudar a prevenir 57,7% das infecções por estes tipos de HPV e conseqüentemente teria um impacto considerável na prevenção do câncer cervical invasor nesta amostra.

Dados sobre a distribuição dos genótipos do HPV no câncer cervical invasivo e em lesões precursoras são essenciais para prever o futuro impacto das novas vacinas HPV16/18, como também para determinar prioridades para inclusão de tipos de HPV em futuras vacinas baseadas em testes com rastreamento de genótipos (91). Mesmo assim, serão necessárias várias décadas para se avaliar o impacto dessas vacinas na prevenção do câncer cervical invasor (20). Concluindo, deve-se estimular a condução de estudos no País que estimem a prevalência e a distribuição dos tipos de HPV entre mulheres com citologia normal, especialmente em áreas economicamente carentes e de difícil acesso a serviços de saúde. Além disso, é essencial conhecer os fatores que contribuem para a regressão, progressão e persistência da infecção do colo do útero pelo HPV, na perspectiva de identificar os grupos de maior vulnerabilidade e risco para a doença, e assim avançar em estratégias para sua prevenção e controle (103-105).

A variabilidade genética do hospedeiro modifica o risco de câncer cervical em mulheres infectadas com HPV oncogênico. Estudos tem relatado uma

associação entre o polimorfismo do códon 72 arginina do gene TP53 e o câncer cervical, mas os resultados são inconsistentes (106-107). No presente estudo observamos a presença do genótipo Arg/Arg em oito (33,3%), Arg/Pro em 15 (62,5%) e Pro/Pro em uma (4,2%). Extensos estudos foram realizados em diferentes regiões de todo o mundo para avaliar o papel do genótipo homozigotos Arg/Arg como um fator de risco associando o HPV a carcinogênese cervical. Em populações do sudeste da Ásia, tais como Taiwan, Tailândia, Coreia, Japão, Hong Kong, e China, o genótipo dos homozigotos Arg/Arg não se correlacionou como um risco para o desenvolvimento de câncer cervical (108). Entre a população hispânica do Brasil, Chile, Peru e na população Africana, o genótipo Arg/Arg foi associado como fator de risco para a carcinogênese do HPV cervical(109), embora, um estudo da Argentina não tenha encontrado uma associação (110). No nosso estudo, as pacientes com o genótipo Arg/Arg apresentaram maior risco de ter infecção por múltiplos genótipos do HPV (RR= 1,77; 1,15 - 2,73;  $p=0,04$ ). Porém, não observamos esta associação na infecção pelo HPV 16 ( $p=0,47$ ) ou HPV 16/18 ( $p=0,51$ ).

Os pacientes com câncer experimentam uma variação individual em condições normais de reações teciduais após a radioterapia. Os sintomas agudos não perduram por muito tempo, mas são às vezes, de gravidade tal que obriga, em cerca de 20% dos pacientes em tratamento, a suspensão temporária da aplicação da radiação (111). Efeitos desfavoráveis do prolongamento do tempo total de tratamento decorrentes da interrupção no tratamento foram também observados em radioterapia pós-operatória, em que nos casos de intervalos maiores de 10 dias houve redução de 10% a 20% na taxa de sobrevivência em cinco anos (112). Estas reações à radioterapia são bastante complexas, com múltiplos fatores genéticos

contribuindo a suscetibilidade de um paciente para tais reações adversas ao tratamento radioterápico. Identificação de marcadores genéticos associados com um risco de reações adversas irá facilitar o desenvolvimento de novos procedimentos para proteger pacientes de alto risco a partir de reações adversas e vai melhorar a nossa compreensão dos mecanismos biológicos de determinação individual de radiosensibilidade (113-114).

Com relação a radiosensibilidade, observadas complicações agudas em 36,4% em nosso estudo, seguindo os critérios do RTOG, as pacientes apenas apresentaram complicações nos tratos gastrointestinal inferior e geniturinário. Apenas duas (7,4%) pacientes suspenderam por sete dias o tratamento. A presença de toxicidade aguda no TGI foi observada em 11 (50%) pacientes, sendo grau 0-1 em cinco (22,7%) e grau  $\geq 2$  em seis (27,3%). A toxicidade aguda no TGU ocorreu em cinco (22,7%), no grupo com grau  $\geq 2$  em três (27,3%). A média de idade das pacientes que apresentaram toxicidade aguda do TGI grau  $\geq 2$  foi significativamente maior que aquelas com toxicidade grau 0-1 ( $67,3 \pm 8,9$  anos e  $48,4 \pm 16,9$  anos respectivamente,  $p= 0,02$ ) e as pacientes com idade  $\geq 50$  anos apresentaram risco 1,8 (1,1 a 2,8) vezes maior de toxicidade  $\geq 2$  ( $p= 0,04$ ). Alguns trabalhos que analisaram efeitos tóxicos agudos ou crônicos da radioterapia observaram uma incidência maior de complicações no grupo com maior idade (115), outros não (116-118). A presença de múltiplos tipos de HPV se associou com maior probabilidade de toxicidade aguda do TGI de grau  $\geq 2$  (66,7% versus 13,3%,  $p= 0,03$ ). Não encontramos artigos na literatura que avaliaram essa associação, os artigos encontrados associaram HPV com resposta clínica de radioterapia. Não houve correlação entre toxicidade aguda do TGI e TGU com HAS, diabete, tabagismo,

TP53 e resposta ao tratamento e nenhuma correlação foi observada no TGU e idade e HPV.

Em relação ao polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*, um número significativo de pacientes apresentaram alterações genéticas nesta região (15 pacientes heterozigotas variantes, representando 62,5%), no entanto, não foi observada nenhuma associação significativa entre este SNP e o desenvolvimento de efeitos colaterais agudos, subagudos e/ou crônicos nos tecidos não acometidos pela neoplasia. A importância da p53 como um supressor tumoral é provavelmente mais ressaltada pelo fato de que o gene p53 está mutado ou deletado em mais 50% de todos os cânceres humanos (119).

Um estudo de revisão feito por Borchiellini em 2012 fez uma abordagem incluindo vários polimorfismos (incluindo o *TP53* Arg72Pro), porém, os genes candidatos usados para construir esta revisão produz dados informativos, mas muitas vezes conflitantes. Os resultados deste trabalho mostram discrepâncias entre as populações estudadas além, da deficiência na metodologia. Dados conclusivos sobre a radioresposta de diferentes tipos de câncer podem ser acarretados por diferentes fatores, como o tamanho de uma população (amostra pequena), diferença na histologia do tumor, estadiamento do tumor, ou da natureza da amostra analisada (114).

Embora, possamos supor que o estado de p53 afeta a radiosensibilidade, sua importância é relativamente baixa, avaliada de forma isolada, o seu valor preditivo é insuficiente para considerar a sua utilização na rotina clínica. Atualmente nenhum teste preditivo para radiosensibilidade tumoral está disponível, mas pode-se supor que o progresso na análise de fatores que

determinam a resposta dos tecidos normais irá rapidamente alargar o progresso nos estudos de radiosensibilidade tumoral (120).

## 6 - CONCLUSÕES

---

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo podemos concluir que:

O HPV16 foi o genótipo de maior prevalência (61,5%), seguido pelo HPV 52 (19,2%) e em terceiro lugar HPV 18(11,5%). A infecção por mais de um genótipo de HPV ocorreu em 26,9% das pacientes.

No sequenciamento do fragmento Arg72Pro, foi observado o genótipo Arg/Arg em 8/24 (33,3%), Arg/Pro em 15/24 (62,5%) e Pro/Pro em 1/24 (4,2%). Foi observado associação da presença do genótipo Arg/Arg com a presença de infecção por múltiplos tipos de HPV (RR= 1,77; 1,15-2,73;  $p=0,04$ ).

O grau de toxicidade aguda  $\geq 2$  do TGI relacionou-se com a idade, onde as pacientes com  $\geq 50$  anos, apresentaram um risco relativo de 1,8 vezes maior (1,1 - 2,8 IC 95%) de radiosensibilidade e com infecção por múltiplos tipos de HPV um risco relativo de 2,6 vezes maior ( $p=0,03$ ). No presente estudo não foi observado correlação entre polimorfismo no fragmento Arg72Pro com radiosensibilidade do TGI, TGU, nem resposta terapêutica.

---

## 7 - REFERÊNCIAS

---

1. Nicol AFF, A t G; Bonecini-Almeida, M G. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection - review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 February 2005;100(1):12.
2. Bamforth J, McLaren H, Osborn GR, Wrigley AJ. Discussion on the value of vaginal cytology in the diagnosis of carcinoma. *Proc R Soc Med.* 1956 May;49(5):245-52.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):17-27.
4. Stanley M. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 2001;52:14.
5. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010 May 25;401(1):70-9.
6. Rosa MI ML, Rosa DD, Bozet- ti MC, Silva FR, Silva BR. Papilomavirus e neoplasia cervical. *Cad Saude Publica.* 2009 maio 2009;25(5):11.
7. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc.* 2008 Mar;107(3):198-217.
8. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9.
9. Cobo F, Concha A, Ortiz M. Human Papillomavirus (HPV) Type Distribution in Females with Abnormal Cervical Cytology. A Correlation with Histological Study. *Open Virol J.* 2009;3:60-6.
10. Waldemar A R; Corleta HVSIEB. Biologia molecular do câncer cervical. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2006 out. / dez., 2006;6(4):5.
11. 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 Feb 6;348(6):518-27.
12. Nobre RJ dAL, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol.* 2008;42(1):9.
13. Herbert J, Coffin J. Reducing patient risk for human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Am Osteopath Assoc.* 2008 Feb;108(2):65-70.
14. Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustav M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009 Apr;5(4):e1000397.
15. Howley PM. Warts, Cancer and Ubiquitylation: Lessons from the Papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006;117:14.
16. Stanley MA. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol.* 2001; 52:14.
17. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics.* 2009;12(5-6):281-90.
18. Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006;2006 Suppl:40470.
19. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans.* 2007 Dec;35(Pt 6):1456-60.
20. Grm HS, Bergant M, Banks L. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian J Med Res.* 2009 Sep;130(3):277-85.
21. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
22. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007 Feb;7(1):79-89.

23. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.
24. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Sep-Oct;15(5):727-46.
25. Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep*. 2002 Mar;4(2):175-83.
26. Brenna SM, Syrjanen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J*. 2003 May 5;121(3):128-32.
27. Bayas JM, Costas L, Munoz A. Cervical cancer vaccination indications, efficacy, and side effects. *Gynecol Oncol*. 2008 Sep;110(3 Suppl 2):S11-4.
28. Borsatto AZ VM, Rocha RCNP. Vacina contra o HPV e a Prevenção do Câncer do Colo do Útero: Subsídios para a Prática. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2011;57(1):8.
29. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
30. Incidência de Câncer no Brasil, estimativa 2012/2011: Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
31. Bezerra SJS GP, Franco, ES; et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo de útero. *DST – J bras Doenças Sex Transm*. 2005;17(2):6.
32. Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer Ministério da Saúde Secretaria Nacional de Assistência à Saúde [serial on the Internet]. 2010.
33. Thuler L. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;30(5):3.
34. Sistema de Informação de Mortalidade Brasil: DATASUS; 2010 [cited 2012 junho]; Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2010/matriz.htm>
35. Lourenco AV, Fregnani CM, Silva PC, Latorre MR, Fregnani JH. Why are women with cervical cancer not being diagnosed in preinvasive phase? An analysis of risk factors using a hierarchical model. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 May;22(4):645-53.
36. Ribeiro K. Epidemiologia do câncer do colo uterino - Fatores demográficos e fatores de risco. In: Coelho Fea, editor. *Câncer do colo do útero*. São Paulo: Tecmedd; 2008. p. 18-25.
37. Howley PM. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006;117:113-26; discussion 26-7.
38. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:8.
39. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011;6(5):e20183.
40. Pecorelli S, Favalli, G., Zigliani, L., and Odicino, F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *J Gynecol Obstet*. [Special Communication.]. 2009:doi:10.1016/j. .
41. Stehman FR, PG; Greer, BE et all. Innovations in the Treatment of Invasive Cervical Cancer. *CANCER Supplement*. 2003;98(9):11.
42. Gusukuma AATR, R L; Sntos, R E; Rodrigues, F F O. . Considerações sobre Pré, Intra e Pós - Operatório do Câncer do Colo do útero Coelho FRGS, Fernando Augusto; Foch, José; Fregnani, José Humberto Tavares Guerreiro; Zeferino, Luiz Carlos; Villa, Luisa Lina; Federico, Miriam Honda; Novaes, Paulo Eduardo Ribeiro dos Santos; Costa, Ronaldo Lúcio Rangel. , editor. São Paulo: Tecmedd; 2008.
43. Schneider A, Erdemoglu E, Chiantera V, Reed N, Morice P, Rodolakis A, et al. Clinical recommendation radical trachelectomy for fertility preservation in patients with early-stage cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 May;22(4):659-66.
44. Berger JL, Ramirez PT. Surgical management of cervical carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2012 Feb;26(1):63-78.

45. Smrkolj S, Pogacnik RK, Slabe N, Rakar S. Clinical outcome of patients with FIGO stage IA2 squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2012 Jan;124(1):68-71.
46. Vieira SC. Tratamento cirurgico do Carcinoma Cervical Invasor. Coelho FRGS, Fernando Augusto; Foch, José; Fregnani, José Humberto Tavares Guerreiro; Zeferino, Luiz Carlos; Villa, Luisa Lina; Federico, Miriam Honda; Novaes, Paulo Eduardo Ribeiro dos Santos; Costa, Ronaldo Lúcio Rangel., editor. São Paulo: Tecmedd; 2008.
47. Narukon T, Tuipae S. Outcomes of Treatment for Cervical Cancer Stage IB2 and IIA2; Radical Hysterectomy and Definitive Radiotherapy. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2012;18(4):181-90.
48. Coutinho L, Sallum L, Derchain S, Sarian L, Simões R. Autoria: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia Sociedade Brasileira de Cancerologia.
49. Berek JS HN, editor. *Cervical cancer.* 5 ed. Philadelphia 2010.
50. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 1986 Mar 6-12;320(6057):84-5.
51. Weston A, Pan C, Ksieski HB, Wallenstein S, Berkowitz GS, Tartter PI, et al. p53 haplotype determination in breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 1997;6(2):105-12.
52. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15.
53. Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausability for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port.* 2011 Jan-Feb;24(1):127-34.
54. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* 2009 Feb;9(2):95-107.
55. Ueda M, Toji E, Nunobiki O, Sato N, Izuma S, Torii K, et al. Germline polymorphisms of glutathione-S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 in cervical carcinogenesis. *Human Cell.* 2010;23(4):119-25.
56. Silva RLA. *Oncogenes e Genes supressores de tumor.* Ferreira CGMC-D-R, J. C., editor. São Paulo Atheneu; 2010.
57. Levav-Cohen Y, Haupt S, Haupt Y. Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors.* 2005 Sep;23(3):183-92.
58. Fei P, El-Deiry WS. P53 and radiation responses. *Oncogene.* 2003 Sep 1;22(37):5774-83.
59. Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, et al. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell.* 2006 Apr;9(4):273-85.
60. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001 Nov 26;20(54):7874-87.
61. Tan XL, Popanda O, Ambrosone CB, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, et al. Association between TP53 and p21 genetic polymorphisms and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Jun;97(3):255-62.
62. Royds JA, Iacopetta B. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):1017-26.
63. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998 May 21;393(6682):229-34.
64. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004 Jun;85(3):301-8.
65. Oliveira S, Sousa H, Santos AM, Pinto D, Pinto-Correia AL, Fontoura D, et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a Portuguese population: a study in exfoliated cervical cells. *J Med Virol.* 2008 Mar;80(3):424-9.
66. Novaes PERS. *Radioterapia.* Coelho FRGS, Fernando Augusto; Foch, José; Fregnani, José Humberto Tavares Guerreiro; Zeferino, Luiz Carlos; Villa, Luisa Lina; Federico, Miriam Honda; Novaes, Paulo Eduardo Ribeiro dos Santos; Costa, Ronaldo Lúcio Rangel., editor. São Paulo: Tecmedd; 2008.
67. Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, Schmezer P. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutat Res.* 2009 Jul 10;667(1-2):58-69.

68. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis--where and how to look for it? *Radiother Oncol.* 2002 Aug;64(2):131-40.
69. Gatti RA. The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol.* 2001;40(6):702-11.
70. Severin DM, Leong T, Cassidy B, Elsaleh H, Peters L, Venter D, et al. Novel DNA sequence variants in the hHR23 DNA repair gene in radiosensitive cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Aug 1;50(5):1323-31.
71. Travis EL. Genetic susceptibility to late normal tissue injury. *Semin Radiat Oncol.* 2007 Apr;17(2):149-55.
72. Bartsch H, Dally H, Popanda O, Risch A, Schmezer P. Genetic risk profiles for cancer susceptibility and therapy response. *Recent Results Cancer Res.* 2007;174:19-36.
73. Vos M, Adams CH, Victor TC, van Helden PD. Polymorphisms and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Jan 1;140(1):23-30.
74. Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagaki N, Wong A, Wasserman R, et al. Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene.* 1994;9(1):327.
75. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995 Mar 30;31(5):1341-6.
76. Radiation Therapy Oncology Group. Acute radiation morbidity scoring criteria. . 2010 [cited 2010 junho de 2010]; Available from: <http://www.rtog.org/members/toxicity/acute.html>.
77. Stevens MP, Garland SM, Tabrizi SN. Human papillomavirus genotyping using a modified linear array detection protocol. *Journal of virological methods.* 2006;135(1):124-6.
78. Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *Journal of virological methods.* 2009;156(1-2):77-83.
79. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol.* 1998 Oct;36(10):3020-7.
80. Lima CA, Palmeira JA, Cipolotti R. [Risk factors for cancer of the uterine cervix in Propria, Sergipe, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2006 Oct;22(10):2151-6.
81. Martins LFL, Thuler LCS, Valente JG. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(8):485-92.
82. Bezerra SJS, Gonçalves PC, Franco ES, Pinheiro AKB. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo de útero. *J bras doenças sex transm.* 2005;17(2):143-8.
83. Murta EFC, Franca HG, Carneiro MC, Caetano M, Adad SJ, Sousa M. Câncer de colo uterino: correlação com o início da atividade sexual e paridade. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1999;21(9).
84. A situação do câncer no Brasil 1. Instituto Nacional do Câncer Ministério da Saúde Secretaria Nacional de Assistência à Saúde [serial on the Internet]. 2006.
85. Ledwaba T, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biol Chem.* 2004 Aug;385(8):671-82.
86. Holschneider CH, Baldwin RL, Tumber K, Aoyama C, Karlan BY. The fragile histidine triad gene: a molecular link between cigarette smoking and cervical cancer. *Clinical cancer research.* 2005;11(16):5756-63.
87. Calzone KA, Soballe PW. Genetic testing for cancer susceptibility. *Surg Clin North Am.* 2008 Aug;88(4):705-21, v.
88. Tharavichitkul E, Klunkin P, Lorvidhaya V, Sukthomya V, Chakrabhandu S, Pukanhaphan N, et al. The effects of two HDR brachytherapy schedules in locally advanced cervical cancer treated with concurrent chemoradiation: a study from Chiang Mai, Thailand. *J Radiat Res.* 2012;53(2):281-7.

89. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999 Apr 15;340(15):1144-53.
90. Jr ES, de Andrade Urban C, Budel VM. Quimioterapia neoadjuvante em câncer localmente avançado do colo do útero. *RBGO.* 2002;24(10).
91. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodríguez AC, Quint W, Schiffman M, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. *Journal of Infectious Diseases.* 2011;203(7):910.
92. Rabelo-Santos S, Zeferino L, Villa L, Sobrinho J, Amaral R, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):181-4.
93. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer.* 2000 Mar;10(2):143-50.
94. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.
95. Cavalcanti S, Zardo L, Passos M, Oliveira L. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *Journal of Infection.* 2000;40(1):80-7.
96. Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, et al. [Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999 May-Jun;32(3):235-40.
97. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of Cancer.* 2007;121(3):621-32.
98. Bogovac Z, Lunar MM, Kocjan BJ, Seme K, Jancar N, Poljak M. Prevalence of HPV 16 genomic variant carrying a 63 bp duplicated sequence within the E1 gene in Slovenian women. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2011 Sep;20(3):135-9.
99. Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, Oki A, Okada S, Minaguchi T, et al. Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer. *Cancer Sci.* 2009 Jul;100(7):1312-6.
100. Munoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer.* 2004;111(2):278-85.
101. Vidal AC, Murphy SK, Hernandez BY, Vasquez B, Bartlett JA, Onoko O, et al. Distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial lesions and cervical cancer in Tanzanian women. *Infectious Agents and Cancer.* 2011;6(1):1-8.
102. Takehara K, Toda T, Nishimura T, Sakane J, Kawakami Y, Mizunoe T, et al. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in uterine cervical squamous lesions from Japanese women. *Patholog Res Int.* 2011;2011:246936.
103. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
104. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of oncology.* 2005;16(3):481-8.
105. Ayres ARG, Silva G. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Revista de Saúde Pública.* 2010;44(5):963-74.
106. Mitra S, Misra C, Singh R, Panda C, Roychoudhury S. Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India. *Journal of clinical pathology.* 2005;58(1):26-31.
107. Hu X, Zhang Z, Ma D, Huettnner PC, Massad LS, Nguyen L, et al. TP53, MDM2, NQO1, and susceptibility to cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2010;19(3):755-61.
108. Wu MT, Liu CL, Ho CK, Wu TN. Genetic polymorphism of p53 and XRCC1 in cervical intraepithelial neoplasm in Taiwanese women. *J Formos Med Assoc.* 2004 May;103(5):337-43.

109. Pegoraro RJ, Rom L, Lanning PA, Moodley M, Naiker S, Moodley J. P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women. *Int J Gynecol Cancer*. 2002 Jul-Aug;12(4):383-8.
110. Abba MC, Villaverde LM, Gómez MA, Dulout FN, Laguens MR, Golijow CD. p53 codon 72 genotypes in HPV infection and cervical disease. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2003;109(1):63-6.
111. dos Santos Jr JCM. Radioterapia-Lesões Inflamatórias e Funcionais de Órgãos Pélvicos. *Rev bras Coloproct*.26(3).
112. Bese NS, Hendry J, Jeremic B. Effects of prolongation of overall treatment time due to unplanned interruptions during radiotherapy of different tumor sites and practical methods for compensation. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2007;68(3):654-61.
113. Ishikawa A, Suga T, Shoji Y, Kato S, Ohno T, Ishikawa H, et al. Genetic Variants of *NPAT-ATM* and *AURKA* are Associated With an Early Adverse Reaction in the Gastrointestinal Tract of Patients With Cervical Cancer Treated With Pelvic Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2011;81(4):1144-52.
114. Borchiellini D, Etienne-Grimaldi MC, Thariat J, Milano G. The impact of pharmacogenetics on radiation therapy outcome in cancer patients. A focus on DNA damage response genes. *Cancer Treatment Reviews*. 2012.
115. Kim HJ, Kim S, Ha SW, Wu HG. Are doses to ICRU reference points valuable for predicting late rectal and bladder morbidity after definitive radiotherapy in uterine cervix cancer? *Tumori*. 2010;94(3):327.
116. Chen SW, Liang JA, Yang SN, Lin FJ. High dose-rate brachytherapy for elderly patients with uterine cervical cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2003 May;33(5):221-8.
117. Ikushima H, Takegawa Y, Osaki K, Furutani S, Yamashita K, Kawanaka T, et al. Radiation therapy for cervical cancer in the elderly. *Gynecologic oncology*. 2007;107(2):339-43.
118. Yoshimura R, Hayashi K, Ayukawa F, Toda K, Iwata M, Oota S, et al. Radiotherapy doses at special reference points correlate with the outcome of cervical cancer therapy. *Brachytherapy*. 2008;7(3):260-6.
119. Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004;23(3):237-57.
120. Hennequin C, Quero L, Favaudon V. [Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]. *Cancer Radiother*. 2008 Jan;12(1):3-13.

## **8 - ANEXOS**

---

### **8.1 Anexo 1**

- *Critérios de inclusão:*

Pacientes maiores de 18 anos, com diagnóstico confirmado histologicamente de câncer de colo de útero IB a IIIB;

Pacientes que serão submetidas a tratamento de radioterapia ;

Pacientes que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

- *Critérios de Exclusão:*

Pacientes que não concordarem em participar do estudo e em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;

Pacientes que tenham estadiamento clínico IV;

Pacientes que tenham perdido seguimento no hospital;

## 8.2 Anexo 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número ficha: \_\_\_\_\_ CID: \_\_\_\_\_ Projeto: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Esse consentimento é exclusivo para esta pesquisa, sem possibilidade de uso dos seus dados para outros projetos. No caso de aceitar fazer parte do estudo após ser esclarecida sobre as informações a seguir, assine no final deste documento que está em duas vias (uma da pesquisadora e a outra sua). Caso você escolha não participar não haverá nenhum tipo de penalidade para você. Em caso de dúvida sobre seus direitos, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge ou o Vice-Coordenador do Comitê de Ética pelo telefone (062) 3243-7000, ramal 7050.

O título da pesquisa é “**Genotipagem do HPV durante a prevenção do câncer de colo do útero: importância do vírus no desenvolvimento do carcinoma escamoso do colo uterino e a influência no prognóstico com a radioterapia**”.

As pesquisadoras responsáveis são a Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi, a Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares e a Dra. Eliane da Silva Ribeiro, que, em caso de dúvidas podem ser contatadas pelos telefones (062) 3243-7139/3243-7059 e 3088-5008.

Sobre a pesquisa:

- O objetivo é desenvolver um estudo inicial sobre carcinomas de colo de útero positivos para o vírus HPV (um vírus encontrado no colo do útero de algumas mulheres com câncer deste local) e seu papel na resposta à radioterapia, que é o tratamento que a senhora irá receber;
- Após a consulta, no momento do exame ginecológico para a realização da braquiterapia em que a senhora será submetida para avaliação antes do tratamento de radioterapia proposta, caso haja a sua permissão, será coletado uma amostra (a mesma quantidade que seria colhida com um contonete) do material citológico (que é colher com uma pequena escovinha a secreção do colo uterino durante o exame ginecológico), para que possamos realizar o estudo nesta secreção;
- Seu acompanhamento e tratamento **não serão alterados em nada** por este estudo.
- Os resultados deste estudo poderão nos ajudar a responder como o vírus HPV interfere na resposta à radioterapia;
- Seus dados pessoais (como nome) permanecerão confidenciais, sem exposição pública, sendo a senhora identificada apenas por um número;
- Se a senhora tiver algum gasto decorrente (por causa) da sua participação nessa pesquisa, terá o direito de ressarcimento;
- Não haverá qualquer compensação financeira por sua participação no projeto de pesquisa;
- A presente pesquisa não acrescenta riscos à senhora pois é apenas uma coleta de secreção durante um exame que já seria realizado, mas se houver necessidade você terá a assistência necessária;

- Caso a senhora se sinta prejudicada por sua participação na pesquisa, poderá requerer indenização;
- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer hora sem prejuízo para seu tratamento ou acompanhamento.

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, prontuário \_\_\_\_\_, concordo em participar da pesquisa acima descrita, como sujeito de pesquisa. Fui devidamente informada e esclarecida sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Goiânia, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente

  
Assinatura da paciente (macroscópica)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

### 8.3 Anexo 3

#### QUESTIONÁRIO

No. \_\_\_\_\_

##### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Raça: ( ) B; ( ) N; ( ) M; ( ) outras. Estado civil: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Telefone de contato: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

##### Dados clínicos:

Gestação: \_\_\_\_\_ Paridade: \_\_\_\_\_ Aborto: \_\_\_\_\_

Comorbidade: \_\_\_\_\_

Estadiamento tumoral (TNM): \_\_\_\_\_

Tipo histológico: Carcinoma escamoso ( ); Adenocarcinoma ( )

HPV: ( ) Sim; ( ) Não Genótipo: \_\_\_\_\_ .

P53 mutado: ( ) Sim; ( ) Não.

Tipo de radioterapia: Teleterapia ( ) Dose: \_\_\_\_\_

Braquiterapia ( ) Dose: \_\_\_\_\_

Dose total: \_\_\_\_\_

Radiossensibilidade: ( ) Sim; ( ) Não.

Quais: \_\_\_\_\_

Complicações: Enterite ( ); Cistite ( ); Lesão de pele ( ); Proctite ( );

Outras: \_\_\_\_\_

Evolução: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

## 8.4 Anexo 4

### PROTOCOLO PCR:LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING TEST

- 1) A quantidade de DNA depende da qualidade do mesmo. Em geral, utiliza-se de 1 a 3 µl de DNA diluídos em 16,5 a 14,5 µl de H2O milliQ autoclavada e 17,5 µl de Máster Mix por reação. (35 µl de produto de PCR são suficientes para verificar a positividade da reação em gel e hibridizar com as tirinhas para genotipagem).
- 2) Usar 17,5 µl de cada controle por reação. Verificar que cada controle é fornecido em um volume de 500 µl.
- 3) Usar um bom kit de extração de DNA e fazer a detecção de HPV direto com o kit Linear Array.
- 4) Abrir cada amostra de DNA com um pequeno papel absorvente, a fim de evitar contaminação das luvas.
- 5) Cada tubo de DNA extraído é rotulado com etiqueta e código de barra e guardado em criocaixas com 96 lugares.
- 6) Trocar de luvas depois de pipetar o Máster Mix e antes de pipetar o DNA. Trocar de luvas sempre que necessário.
- 7) O Máster Mix deve ser preparado com Cloreto de Magnésio. Para cada 580 µl de Mix, adicionar 125 µl de Cloreto de Magnésio. Fazer regra de 3 para volumes menores.
- 8) Não é preciso fazer nada no gelo. Homogeneizar o Mix por inversão de 15 a 20 vezes e evitar bolhas.
- 9) Colocar os tubos no termociclador e usar o seguinte programa de ciclagem:

95°C	- 13 min	} 1 ciclo
95°C	- 60 sec	
55°C	- 60 sec	} 40 ciclos
72°C	- 60 sec	
72°C	- 5 min	
- 10) Após a ciclagem, colocar 5µl do produto de PCR no gel e visualizar os casos positivos.

- 11) A cada 30 µl de produto de PCR restante, adicionar 30 µl de solução de desnaturação.
- 12) Corar o gel com GelRed - 5µl para cada 60 ml de água ( Biotium Inc. GelRed - 10.000 X DMSO – cat 41002-T).
- 13) Usar um marcador de peso molecular de 100bp, para visualizar as bandas do PGM<sub>y</sub>09/11.

## **DETECÇÃO E REVELAÇÃO: LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING TEST**

### **DETECÇÃO**

#### **A) Desnaturação do produto da PCR:**

- 1) Marcar os microtubos. Adicionar 40 µl de Amplicor Denaturation Solution a cada tubo de reação e igualmente 40 µl do produto de PCR. Armazene o restante do produto de PCR a -20°C.
- 2) Deixar a mistura à temperatura ambiente, durante pelo menos 10 minutos.

#### **B) Preparo dos Reagentes e Soluções de Detecção:**

a) Reserve tempo suficiente para dissolver as soluções de SSPE 20X e o SDS 20%, em banho-maria 37°C, antes de preparar os reagentes. Todos os cristais devem ser dissolvidos antes do uso.

**Tampão de Hibridização:** certifique-se que o SSPE e SDS estejam totalmente dissolvidos e prepare a solução de uso em água milliQ. O Tampão de Hibridização deve ser armazenado à temperatura ambiente num recipiente limpo e permanece estável durante 30 dias.

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>	<b>Volume</b>	<b>Volume</b>
<b>SSPE 20X</b>	100 ml	33,3 ml	11,1 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	388 ml	129 ml	43 ml
<b>SDS 20%</b>	12,5 ml	4,17 ml	1,39 ml
<b>Volume</b>	500,5 ml	166,47 ml	55,49 ml

**Tampão de Lavagem:** certifique-se que o SSPE e SDS estejam totalmente dissolvidos e prepare a solução de uso em água milliQ. O Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho deve ser armazenado à temperatura ambiente num recipiente limpo e permanece estável durante 30 dias.

O Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho é usado à temperatura ambiente, enquanto o Tampão de Lavagem Estrito de Trabalho é usado pré-aquecido à 53°C e deve ser preparado a fresco antes de cada reação. O volume a ser aquecido é de 5 vezes o número de reações, pois cada lavagem é feita com 5 ml.

Reagente	Volume	Volume	Volume
SSPE 20X	133 ml	66,6 ml	33,25 ml
H2O	2520 ml	1260 ml	630 ml
SDS 20%	13,3 ml	6,65 ml	3,325 ml
Volume	2.666,30 ml	1.333,25 ml	666,625ml

**Citrato de Sódio (CIT):** depois de certificar que o citrato está totalmente dissolvido, prepare a solução de uso, em água milliQ. O tampão citrato deve ser armazenado à temperatura ambiente num recipiente limpo e permanece estável durante 30 dias.

Reagente	Volume 100 tiras	Volume 50 tiras	Volume 25 tiras
Citrato	25 ml	12,5 ml	6,25 ml
H2O	475 ml	237,5 ml	118,75 ml
Volume	500 ml	250 ml	125 ml

**Conjugado de Trabalho:** deve ser preparado na hora da reação e armazenado à temperatura ambiente, sendo estável durante 3 horas.

Reagente	Volume	Volume	Volume
AS-HRP	15µl	30 µl	60 µl
Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho	5 ml	10 ml	20 ml
Volume	1 reação	2 reações	4 reações

**Substrato de Trabalho:** deve ser preparado na hora da reação e armazenado à temperatura ambiente, sendo estável durante 3 horas, desde que protegido da exposição à luz direta. Embrulhar em papel alumínio.

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>	<b>Volume</b>	<b>Volume</b>
<b>Sub A</b>	4µl	8 µl	32 µl
<b>Sub B</b>	1 ml	2 ml	4 ml
<b>Volume</b>	<b>1 reação</b>	<b>2 reações</b>	<b>4 reações</b>

### **C) Etapas de Hibridização e Lavagens:**

- 1) Antes de iniciar a hibridização, preparar o banho-maria com agitação a 53°C, com pouca água e pré-aquecer o Tampão de Hibridização de Trabalho e o Tampão de Lavagem Estrito de Trabalho, durante um período mínimo de 15 minutos. Deixar o Tampão de Hibridização de Trabalho e o Tampão de Lavagem Estrito de Trabalho no banho-maria até o momento de ser usado.
- 2) Retire o número necessário de tiras de genotipagem Linear Array HPV da embalagem de HPVStrip, usando uma pinça limpa.
- 3) Com uma caneta de tinta permanente à prova d'água; substâncias químicas; calor, rotule cada tira HPVStrip com a identificação adequada da amostra ou controle.
- 4) Coloque cada tira com as bandas da sonda viradas para cima no reservatório adequado da bandeja de 24 canaletas.
- 5) Adicione 4 ml do Tampão de Trabalho pré-aquecido a cada reservatório contendo uma tira rotulada.
- 6) Utilizando uma pipeta com ponteira com filtros para aerossóis, pipete cuidadosamente 30 µl de amplicon desnaturado para a canaleta adequada contendo a respectiva HPVStrip devidamente rotulada. Use uma ponteira nova para cada amplicon transferido.
- 7) Tampe a bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja no banho a 53°C. Coloque um peso de aproximadamente 0,5 Kg sobre a tampa da bandeja para fixá-la e

mantê-la tampada durante a agitação. Hibridize as HPVStrips durante 30 minutos, a uma velocidade de 60 RPM.

8) Durante a hibridização, prepare o Conjugado de Trabalho, conforme descrição da tabela acima.

9) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Hibridização, mediante aspiração à vácuo.

10) Adicione 4 ml do Tampão de lavagem Ambiente de Trabalho a cada canaleta. Agite suavemente a bandeja por 3 a 4 vezes para lavar as tiras e aspire imediatamente a vácuo o Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho das canaletas.

11) Adicione 4 ml do Tampão de Lavagem Estrito de Trabalho a cada canaleta contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa de volta na bandeja e leve a bandeja ao banho-maria em agitação a 53°C. Coloque o peso de aproximadamente 0,5 Kg novamente sobre a tampa da bandeja para fixá-la e mantê-la tampada durante a agitação. Lave as HPVStrips durante 15 minutos, a uma velocidade de 60 RPM.

12) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Lavagem Estrito de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

13) Adicione 4 ml do Conjugado de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa na bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja sobre um agitador orbitário à temperatura ambiente. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) a uma velocidade de agitação de aproximadamente 60 RPM.

14) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Conjugado de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

15) Adicione 4 ml do Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Agite suavemente a bandeja de 24 canaletas 3 a 4 vezes para lavar as tiras e aspire imediatamente a vácuo do Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho das canaletas.

16) Adicione 4 ml do Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa na bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja sobre um agitador orbitário à temperatura ambiente, durante 10 minutos à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) a uma velocidade de agitação de aproximadamente 60 RPM.

17) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

18) Adicione 4 ml do Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa na bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja sobre um agitador orbitário à temperatura ambiente, durante 10 minutos à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) a uma velocidade de agitação de aproximadamente 60 RPM.

19) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

20) Adicione 4 ml do Tampão Citrato de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa na bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja sobre um agitador orbitário à temperatura ambiente, durante 5 minutos à temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) a uma velocidade de agitação de aproximadamente 60 RPM.

21) Prepare o Substrato de Trabalho conforme descrito na tabela acima.

22) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

23) Adicione 4 ml do Substrato de Trabalho a cada reservatório contendo uma tira. Limpe qualquer condensação formada na tampa da bandeja com uma folha de papel limpa, coloque a tampa na bandeja de 24 canaletas e coloque a bandeja sobre um agitador orbitário à temperatura ambiente, durante 5 minutos à temperatura

ambiente (entre 15°C e 30°C) a uma velocidade de agitação de aproximadamente 60 RPM.

24) Retire a bandeja de 24 canaletas do banho-maria e retire o Tampão de Lavagem Ambiente de Trabalho, mediante aspiração à vácuo.

25) Adicione 4 ml de água destilada ou deionizada a cada canaleta contendo uma tira.

26) Remova as tiras da bandeja de 24 canaletas utilizando uma pinça limpa, coloque-as numa superfície limpa e seca e deixe as tiras secar ao ar durante o mínimo de uma hora ou até 72 horas à temperatura ambiente antes da interpretação.

#### D) LAVAGEM DAS BANDEJAS

1) Prepare uma solução de RBS a 10% adicionando uma parte de RBS35 e 9 partes de água deionizada.

2) Encha cada reservatório da bandeja com a solução a 10% e deixe embeber durante a noite à temperatura ambiente.

3) Irrigue abundantemente a bandeja com água deionizada.

4) Enxagüe em álcool 70% duas vezes e deixe secar, embrulhada em papel na estufa.