



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**SOBREVIDA E FATORES DE PROGNÓSTICO EM
PACIENTES COM CÂNCER INVASIVO DO COLO
UTERINO**

CARLA LIMEIRA BARRETO

**RECIFE / PE
2012**

CARLA LIMEIRA BARRETO

**SOBREVIDA E FATORES DE PROGNÓSTICO EM
PACIENTES COM CÂNCER INVASIVO DO COLO
UTERINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientadora : Prof^a. Dra^a. Vera Magalhães da Silveira MD, PhD

RECIFE / PE

2012

Catalogação na fonte
Bibliotecária Andréa Marinho, CRB4-1667

B273s

Barreto, Carla Limeira.

Sobrevida e fatores de prognóstico em pacientes com câncer invasivo do colo uterino / Carla Limeira Barreto – Recife: O autor, 2012.
71 folhas: il. ; fig.: 30 cm.

Orientador: Vera Magalhães da Silveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
Inclui bibliografia, apêndice e anexos.

1. Útero- câncer. 2. Útero- câncer- prognóstico. 3. Papilomavírus.
I. Silveira, Vera Magalhães (Orientador). II. Título.

616.99266

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-114)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

CARLA LIMEIRA BARRETO

No dia 09 de março de 2012, às 08h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP/UFPE, os Membros Doutores a Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel – Presidente da Banca (UFPE), a Prof^a. Dr^a. Silvana Maria de Moraes Cavalcanti (UPE), a Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque (UPE), o Prof. Dr. Tarcísio José Cysneiros da Costa Rêgo (HUOC) e o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda **CARLA LIMEIRA BARRETO** sobre a sua Tese intitulada **“SOBREVIDA E FATORES DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CÂNCER INVASIVO DO COLO UTERINO”**, a qual foi orientada pela Prof^a. Dra. Vera Magalhães da Silveira (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

APROVADA

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria de Moraes Cavalcanti

APROVADA

Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque

APROVADA

Prof. Dr. Tarcísio José Cysneiros da Costa Rêgo

APROVADA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

APROVADA

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria de Moraes Cavalcanti

Prof^a. Dr^a. Valéria Maria Gonçalves de Albuquerque

Prof. Dr. Tarcísio José Cysneiros da Costa Rêgo

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE REITOR

Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

VLáudia Maria Assis Costa

Aos meus pais queridos Felício e Anna Luiza por
tudo que representam para mim. Aos meus filhos
Oscarzinho e Gabriel e a meu marido Oscar, pelo
amor que sempre me dedicam.

AGRADECIMENTOS

Toda pesquisa científica engloba uma série de fatores técnicos como coleta, tipo e condição do material, análise dos dados, etc. Todavia a participação de pessoas, particularmente aquelas que facilitam o seu acesso a setores que não fazem parte da sua rotina diária, é imprescindível para realização de qualquer trabalho científico.

Agradeço a Dra. Maria da Conceição de Aguiar Lyra e aos funcionários do Centro Integrado de Anatomia Patológica (CIAP) e do Arquivo Médico do Hospital Universitário Oswaldo Cruz.

À Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pela realização da *nested* PCR.

Pela atenção que sempre me dedicou, agradeço a Dra. Maria Teresa Cartaxo Muniz.

Ao Dr. Jonathan A. Melo e as funcionárias dos Institutos de Radioterapia Ivo Roesler e Waldemir de Miranda.

Agradeço a Prof.^a Vera Magalhães pelo incentivo, orientação e confiança que sempre me dedicou. Foi uma honra tê-la como minha orientadora.

E por fim, agradeço sobretudo as mulheres que com sua história clínica, contribuíram para este estudo.

"Todos nós sabemos alguma coisa.

Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso, aprendemos sempre".

Paulo Freire (1921-1997)

RESUMO

BARRETO, Carla Limeira, Sobrevida e fatores de prognóstico em pacientes com câncer invasivo do colo uterino. 71f. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco- Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, Pernambuco.

Em países desenvolvidos, o uso rotineiro dos testes de triagem como o Papanicolau tem assegurado declínio nas taxas de incidência e de mortalidade do câncer do colo uterino. No Brasil, apesar da redução destas taxas nas últimas décadas, seus valores ainda continuam elevados, em parte em virtude das condições precárias de higiene e saúde, bem como devido a dificuldade de acesso de uma parcela da população aos programas de saúde governamentais. O objetivo deste estudo retrospectivo foi avaliar entre os fatores clínico-patológicos e a presença do Papilomavírus humano (HPV) quais teriam relação com a evolução da doença. De um total de 344 mulheres atendidas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009, foram obtidos dados cadastrais, de diagnóstico e de seguimento das pacientes. A idade média das mulheres foi 52 (± 14) anos, com 52% dos casos oriundos do interior do estado ou de cidades próximas a Pernambuco. Não havia informação sobre o tabagismo (57%) e sobre a realização de exames de prevenção em 75% dos prontuários e destes em apenas 11% constava a frequência com que as pacientes realizavam seus exames. Houve o predomínio do carcinoma escamoso (86%) e de estadiamento clínico avançado (\geq IIB) em 84% dos casos. Duzentas e setenta e duas pacientes (79%) realizaram tratamento oncológico e em 183 pacientes nas quais foi possível a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa do HPV, 78 (42%) tiveram a presença do vírus confirmada. A média de seguimento foi 2,7 ($\pm 2,5$) anos. Os resultados mostram que o único fator prognóstico importante na resposta e na evolução da neoplasia foi o estadiamento clínico. A detecção do HPV, a duração da radioterapia e a quimioterapia associada à radioterapia não tiveram influência no prognóstico.

Palavras chave: Câncer do colo uterino, fatores de prognóstico, HPV, seguimento.

ABSTRACT

BARRETO, Carla Limeira, Survival and prognostic factors in patients with invasive cervical cancer. 71s. Doctoral Thesis, Federal University of Pernambuco.. Center for Health Sciences. Post Graduate Program in Tropical Medicine. Recife, Pernambuco.

In developed countries, the routine use of screening tests like the Pap smear has ensured the decline in the incidence and mortality of cervical cancer. In Brazil, despite the reduction in these rates in recent decades, their values are still high, partly because of bad hygiene and health conditions as well as due to difficulty of access of a portion of the population to government health programs. The purpose of this study was to evaluate between clinicopathological factors and the presence of human papillomavirus (HPV) which have relation with disease progression. Of a total of 344 women treated between January 2000 and December 2009 were obtained registry information, diagnosis and follow-up of the patients. The average age of women was 52 (\pm 14) years, with 52% coming from the state or towns near Pernambuco. There was no information about smoking (57%) and on the prevention examinations in 75% of these records and only 11% concerned the frequency with which patients performed their tests. There was a predominance of squamous cell carcinoma (86%) and advanced clinical stages (\geq IIB) in 84% of the cases. Two hundred and seventy-two patients (79%) underwent oncological treatment and 183 patients in which it was possible to perform Polymerase Chain Reaction (PCR) for HPV, 78 (42%) had confirmed the presence of the virus. The mean follow up was 2,7 (\pm 2,5) years. The results show that the only important prognostic factor in the response and evolution of the neoplasm was the clinical stage. The HPV detection, duration of radiotherapy and chemotherapy combined with radiotherapy had no influence on prognosis.

Keywords: Cervical cancer, prognostic factors, HPV, follow-up.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global das mulheres com câncer do colo uterino

Figura 2. Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida livre de doença (mulheres com resposta completa ao tratamento oncológico).

Figura 3. Curvas de sobrevida de pacientes com câncer do colo uterino, segundo o tempo de duração do tratamento radioterápico.

Figura 4. Curvas de sobrevida das mulheres com câncer do colo uterino estadio II a IVA, que se submeteram à radioterapia exclusiva ou combinada à quimioterapia.

Figura 5. Curvas de sobrevida de pacientes com câncer do colo uterino, segundo o estadiamento clínico.

ARTIGO 2

Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida global em pacientes com câncer da cérvix uterina.

Figura 2. Curvas de sobrevida segundo o resultado do HPV em mulheres com câncer do colo uterino.

Figura 3. Curva de Kaplan Meier, segundo o estadiamento clínico, em pacientes com câncer da cérvix uterina.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Distribuição de frequência de idade, histologia, grau histológico e estadiamento em mulheres com câncer invasivo do colo uterino.

Tabela 2. Associação entre idade, tipo histológico, grau histológico, estadiamento e resposta em pacientes com câncer invasivo do colo uterino.

ARTIGO 2

Tabela 1. Associações entre variáveis clínicas, demográficas e HPV em pacientes com câncer da cérvix uterina.

Tabela 2. Associação entre idade, tipo histológico, grau histológico, estadiamento e resposta ao término do tratamento oncológico em pacientes com câncer do colo uterino.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CEC	Carcinoma escamoso
D	Dia
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
BQT	Braquiterapia Intracavitária com Alta Taxa de Dose
EC	Estadio clínico
FIGO	“Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique” (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia)
Gy	Gray (expressa a dose de radiação absorvida por qualquer material ou tecido humano)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana adquirida)
HPV	Human Papilloma Virus (Papilomavírus humano)
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
mg/m ²	Miligrama por metro quadrado
min	Minutos
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)
RR	Risco Relativo
RT	Radioterapia externa
seg	Segundos
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1/TH2	Linfócito T helper 1 / Linfócito T helper 2
UNACON	Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia

SUMARIO

RESUMO

ABSTRACT

1. APRESENTAÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Geral.....	22
3.2. Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Desenho do estudo.....	23
4.2. Locais do estudo.....	23
4.3. População do estudo.....	23
4.4. Variáveis.....	24
4.4.1 Variáveis dependentes.....	24
4.4.2 Variáveis independentes.....	25
4.5. Operacionalização da pesquisa.....	26
4.6. Considerações éticas.....	29
4.7. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1. ARTIGO 1	
Sobrevida e fatores de prognóstico em pacientes com câncer invasivo	
do colo uterino	31
5.2. ARTIGO 2	
Detecção do Papilomavírus humano em biópsias de pacientes	
com câncer da cérvix uterina e associação com prognóstico.....	47
6. CONCLUSÕES DA TESE.....	62
7. REFERÊNCIAS...DA TESE	63
APÊNDICES.....	67
Apêndice A – Questionário da Pesquisa	
ANEXOS.....	70
Anexo A - Estadiamento clínico do câncer do colo uterino	
Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UPE	

1. APRESENTAÇÃO

O câncer do colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres. Aproximadamente 529 mil casos novos são diagnosticados por ano no mundo, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA). No Brasil, são estimados 17.540 casos novos para 2012, sendo a previsão para o estado de Pernambuco de 17,54/100.000 e para a cidade do Recife de 21,72/100.000 habitantes (INCA, 2012).

A prevalência do câncer do colo uterino é elevada em todo o mundo e, apesar dos grandes avanços em novos tratamentos para os tumores malignos, é ainda bastante elevado o número de óbitos por esta neoplasia. Em virtude deste prognóstico sombrio, é frequente a realização de pesquisas sobre a relação desta neoplasia com alguns fatores que possam interferir em sua progressão, tentando descobrir novas metas terapêuticas. Com exceção do papel já bem estabelecido do Papilomavírus Humano (HPV) na gênese do tumor e da importância do estadiamento clínico, alguns fatores, tais como: genótipo viral, clareamento do vírus após o tratamento oncológico, produção e polimorfismos de citocinas, têm sido continuamente estudados para estabelecer perfis de prognóstico desta neoplasia.

Apesar da importância do tema principalmente do ponto de vista de saúde pública, são poucos os estudos realizados no país sobre fatores de prognóstico e sobrevida em pacientes com câncer invasivo do colo uterino, sobretudo na região nordeste. A proposta desta pesquisa é avaliar a associação da idade, o tipo e grau histológico, a presença do HPV, o estadiamento clínico e o tratamento realizado na evolução da doença em mulheres com câncer do colo uterino. Os resultados serão apresentados na

forma de dois artigos, o primeiro intitulado “Sobrevida e fatores de prognóstico em pacientes com câncer invasivo do colo uterino” encaminhado para o *“International Journal of Gynecology & Obstetrics”* e o segundo intitulado “Detecção do papilomavírus humano em biópsias de pacientes com câncer da cérvix uterina e associação com prognóstico” enviado para publicação no *“Archives of Gynecology and Obstetrics”*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O câncer do colo uterino é responsável pelo óbito de cerca de 240 mil mulheres por ano em todo o mundo, sendo a segunda causa de neoplasia maligna entre as mulheres dos 20 aos 39 anos nos Estados Unidos (OMS, 2008; EIFEL et al., 2011). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, são esperados 17.540 casos novos no Brasil em 2012, com um risco estimado de 17 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2012). A realização de testes rotineiros de triagem, como o teste de Papanicolau, tem levado à redução da mortalidade desta neoplasia, permitindo o diagnóstico precoce das lesões iniciais, como é o caso da neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

A associação deste tumor com fatores sócio econômicos é bem descrita na literatura médica. O câncer do colo uterino é mais frequente em países em desenvolvimento, em população de baixa renda, nas mulheres com início precoce de atividade sexual e com grande número de parceiros (INCA, 2012). Ao contrário de outros tumores malignos, é conhecida a associação direta desta neoplasia com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Mais de 100 subtipos virais de HPV foram descritos até o momento e em geral a infecção regredie espontaneamente, sem nenhum tipo de tratamento (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2002).

A persistência do HPV por seis meses ou mais é encontrada em pacientes mais velhas, naquelas com infecção por múltiplos subtipos virais e com subtipos de maior poder oncogênico (HO et al., 1998). Os subtipos virais 16 e 18 seriam considerados os de maior potencial oncogênico, ao passo que

os subtipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 conferem risco intermediário para o desenvolvimento desta neoplasia (LOMBARD et al., 1998). Outra forma de classificação descreve quinze subtipos de HPV como sendo de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), três como provavelmente de alto risco (26, 53 e 66) e doze de baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108) (MUÑOZ et al., 2003). Em um estudo realizado em Taiwan com 149 pacientes, apenas a infecção pelos genótipos 16 e 18 teve importância na sobrevida global (RR 2,33, p=0,016) em comparação aos demais subtipos (HUANG, H. J. et al., 2004). Entre os vírus de alto risco, o HPV 31 acarretaria numa melhor sobrevida da paciente com tumor do colo uterino em relação a pacientes com outros subtipos virais (HUANG, L. W. et al., 2004).

Com o conhecimento adquirido da participação do HPV na oncogênese do câncer cervical, o próximo passo foi o desenvolvimento de vacinas para prevenir a infecção, visando assim a redução da incidência desta neoplasia (CRUM et al., 2003; MANDIC & VUJKOV, 2004). No entanto, até que o uso desta vacina se torne rotineiro e que haja um impacto na incidência do câncer do colo uterino, resta-nos avaliar fatores de prognóstico e propostas terapêuticas que visem minorar o sofrimento das pacientes acometidas por esta doença.

Outros fatores são descritos ter associação com a progressão de lesões intraepiteliais, como é o caso da superexpressão da survivina (fator inibidor da apoptose) e os baixos índices de expressão do gene supressor de tumor p53, geralmente encontrados em lesões cervicais de alto grau (KURVINEN et al., 1996; BRANCA, et al., 2005).

Quanto a histologia, o tipo histológico mais encontrado no câncer do colo uterino é o carcinoma epidermóide, no entanto, este quadro é invertido em pacientes infectadas pelo HPV 18, que apresenta uma maior associação com o surgimento de adenocarcinoma (HUANG, H. J. et al, 2004; IM et al., 2003) A disseminação linfonodal, fator prognóstico importante nesta neoplasia, tem sido associada com o tipo histológico (carcina epidermóide principalmente em pacientes com estadio I e IIa) e com o genótipo viral encontrado (16 ou 18) (IM et al, 2003; FREGNANI et al., 2007; PILCH et al., 2001).

Existe também descrição de diferenças quanto à agressividade da doença e à resposta clínica ao tratamento oncológico de acordo com o subtipo viral. Enquanto há relatos de uma fraca associação em tumores iniciais (estádio I e II), outros conferem à presença e persistência do vírus, um maior risco de disseminação linfonodal, mesmo em pacientes com doença inicial, bem como uma maior taxa de recorrência destes tumores após radioterapia e/ou quimioterapia (VILADIU et al., 1997; HERNANDI et al., 2003; LINDEL et al., 2005; NAGAI et al., 2004; NOBEYAMA et al., 2004).

Outro fator importante quando se estuda a evolução da lesão inicial do colo uterino é a sua associação com a resposta imune, a qual tem papel importante na história natural da infecção pelo HPV, principalmente a imunidade celular. Este fato é particularmente evidente em mulheres infectadas pelo HIV. Nestes casos, o carcinoma cervical tende a ser mais agressivo, mesmo quando diagnosticado na fase inicial, menos responsivo aos tratamentos tradicionais e com sua gravidade diretamente ligada ao grau de imunodepressão induzido pelo HIV (PAULO et al., 2007).

A produção de citocinas pelos linfócitos T auxiliares também pode estar desregulada em pacientes com HPV. Os linfócitos T auxiliares são classificados como Th1 e Th2 de acordo com a produção de citocinas: Th1 secretam interleucina 2 (IL-2) e interferon gama (IFN- γ) e Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (WU & KURMAN, 1997). Ao contrário da IL-4 e IL-6, a interleucina 10 não desenvolve o padrão Th2 de resposta de citocinas, mas inibe o desenvolvimento das células Th1 e a produção de linfotoxinas pelo bloqueio dos macrófagos (FARZANEH et al., 2006). Em lesões cervicais precoces, a produção elevada de IL-10 pode inibir a resposta imune ao HPV (AZAR et al., 2004). Nestas lesões iniciais do colo uterino, a presença elevada de produção intralesional de IL-10 e IFN - γ em pacientes com infecção pelo HPV16 quando comparadas com aquelas HPV16 negativas poderia facilitar a transformação neoplásica (FERNANDES et al., 2005). Não só a produção elevada de citocinas, mas também a presença de determinados polimorfismos das mesmas seriam implicadas na evolução da doença. O polimorfismo do alelo G na posição 1082 da IL-10 é associado com clareamento da infecção por HPV (FARZANEH et al., 2006).

No campo do tratamento oncológico, a proposta terapêutica varia de acordo com o tamanho e a extensão tumoral (HAIE-MEDER et al., 2010). Embora não haja definição formal, o câncer avançado do colo uterino usualmente inclui estadio clínico maior ou igual a IB2 (BARBERA & THOMAS, 2009). A cirurgia é considerada tratamento padrão para os estágios iniciais, sendo a radioterapia a segunda opção terapêutica (PECORELLI et al., 2006; PETGNAT & ROY, 2007). A escolha do tratamento depende de uma série de fatores, entre eles: a idade, a existência de comorbidades, o tamanho tumoral,

a invasão do espaço linfovascular e mesmo da preferência do médico e da disponibilidade dos recursos terapêuticos (BARBERA & THOMAS, 2009). Em estágios avançados, a radioterapia exclusiva foi proposta como tratamento padrão por vários anos, sendo o tempo do tratamento radioterápico considerado como principal fator responsável como determinante na resposta e evolução da doença (OTA et al., 2007; GIRINSKY et al., 1993; LANCIANO et al., 1993). Desde 1999, com a publicação de estudos randomizados que mostraram ganho de sobrevida com a adição de quimioterapia (particularmente com o uso de platinas) à radioterapia, o tratamento concomitante de quimioterapia e radioterapia passou a ser considerado como tratamento padrão em estágios avançados (MORRIS et al, 1999; ROSE ET AL., 1999 , 2003; KEYS et al., 1999; GREEN et al., 2010; VALE et al., 2010).

Enfim, a definição e a compreensão de qual fator, ou fatores, podem interferir na evolução do câncer do colo uterino tem sido objeto frequente de pesquisa, e este é um campo ainda muito pouco explorado no nosso país.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar entre os parâmetros clínico-patológicos (idade, estadiamento clínico, tipo e grau histológico, tempo e tipo do tratamento oncológico realizado) e a presença do Papilomavírus humano (HPV), quais os principais fatores de risco na evolução do câncer invasivo do colo uterino.

3.2. Específicos

- a. Determinar a frequência da presença do DNA do HPV (através da reação em cadeia da polimerase – PCR) em blocos de parafina contendo biópsia de mulheres com câncer do colo uterino.
- b. Avaliar que parâmetros clínico-patológicos interferem na resposta ao tratamento e evolução do câncer do colo uterino.
- c. Verificar a associação do HPV com a evolução do câncer do colo uterino .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo analítico, tipo coorte retrospectiva.

4.2 Locais do estudo

A pesquisa foi realizada nos seguintes locais:

- Centro de Oncologia (CEON) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, credenciado como Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) e considerado pelo Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde (SUS / MS) como hospital de referência em oncologia do estado de Pernambuco.
- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco, que atua no diagnóstico e na proposição de novos procedimentos terapêuticos, em doenças genéticas, infecciosas, doenças adquiridas ou auto-imunes.

4.3 População do estudo

4.3.1 População Alvo

Mulheres com diagnóstico clínico e histológico de carcinoma invasivo do colo uterino, atendidas no Centro de Oncologia (CEON) do Hospital Oswaldo Cruz, no período de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2009.

4.3.2 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra

A amostra da pesquisa é não probabilística, constituída pela demanda espontânea de todas as pacientes com diagnóstico de carcinoma do colo uterino, atendidas no período da pesquisa no Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz, hospital de referência do estado para o tratamento de câncer.

Critério de inclusão

Todas as pacientes com diagnóstico de câncer invasivo do colo uterino, atendidas no Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz no período da pesquisa.

Critério de exclusão

Pacientes com presença de um segundo tumor primário ou que tenham realizado tratamento quimioterápico ou radioterápico prévios para outra neoplasia maligna.

Pacientes cujos prontuários apresentavam dados incompletos.

Pacientes menores de 18 anos.

4.4 Categorização das variáveis

4.4.1 Variáveis dependentes

Primeiro Desfecho:

Resposta ao tratamento, a qual será dividida em duas categorias:

a) resposta completa (nenhuma evidência clínica e/ou histológica de doença na reavaliação após o tratamento oncológico).

b) resposta não completa (persistência de doença clínica e/ou histológica, ou doença em progressão).

Segundo Desfecho:

Sobrevida livre de doença (tempo decorrido entre a data da obtenção de resposta completa ao tratamento e o aparecimento de recidiva clínica ou histológica).

Terceiro Desfecho:

Sobrevida global, sendo a data da primeira consulta o ponto de partida da avaliação.

4.4.2 Variáveis independentes:

a) DNA do HPV:

- Positivo
- Negativo
- Indeterminado

b) Idade:

- Menor ou igual a 39 anos
- 40 a 54 anos
- Maior ou igual a 55 anos

c) Procedência:

- Região Metropolitana
- Interior

d) Estadiamento clínico*:

- I

- II
- III
- IV

e) Tipo histológico:

- Carcinoma epidermóide
- Adenocarcinoma
- Carcinoma mal diferenciado
- Outros

f) Grau histológico:

- Bem diferenciado
- Moderadamente diferenciado
- Mal diferenciado

g) Tratamento:

- Cirurgia
- Radioterapia
- Combinado (Quimioterapia + Radioterapia)

* Baseado no estadiamento clínico proposto pela “*Fédération Internationale de Gynécologie et d’Obstétrique*” (FIGO), anexo 1

4.5 Operacionalização da pesquisa

Todas as pacientes com suspeita ou com diagnóstico de câncer do colo uterino foram atendidas inicialmente no ambulatório de cirurgia oncológica do Centro de Oncologia do Hospital Oswaldo Cruz. No primeiro atendimento foi realizado exame clínico e biópsia do tumor (quando ainda não havia

confirmação histológica). Os casos foram estadiados de acordo com as diretrizes da FIGO, baseando-se em resultados do exame físico, radiológicos e ultrassonográficos. A proposta nos estágios I, IIA e IIB era cirurgia e/ou radioterapia. Nos estádios IIIA, IIIB e IVA foi realizada radioterapia exclusiva ou combinada à quimioterapia. Pacientes do estadio IVB foram submetidas a quimioterapia paliativa ou tratamento clínico de suporte. As pacientes tratadas eram examinadas em média após dois meses do término do tratamento para avaliação da resposta. As avaliações posteriores eram trimestrais nos primeiros dois anos após o tratamento e semestrais a partir do terceiro ano de seguimento.

Os blocos de parafina contendo biópsia do câncer do colo uterino foram submetidos a pesquisa do HPV através da *nested* PCR, sendo esta pesquisa realizada no LIKA. Blocos de parafina contendo tecido cervical foram submetidos a cortes de 3 a 5 μm . Ao tecido parafinado foi adicionado xileno para remoção da parafina e posteriormente etanol 100% foi utilizado para retirar os traços de xileno do tecido trabalhado. O etanol foi seco ao ar livre e o tecido homogeneizado com 20 μL de SDS 20%, 80 μL tampão (NaCl 0,375 M, EDTA 0.12 M, pH 8.0), e 40 μL de proteinase K (10 mg/mL). Água esterilizada foi adicionada para o volume final de 380 μL . O tubo contendo a reação foi incubado a 55°C por 16 horas. Posteriormente, 100 μL de NaCl 6M foi adicionado à amostra para precipitação das proteínas por centrifugação à 10.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foi adicionado 1 mL de etanol a 100%. A amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 5 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 70% e evaporado ao ar livre. Finalmente, o precipitado foi suspenso em 50 μL de tampão TE (Tris-Cl 10

mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e estocado a menos 20°C até a realização do teste molecular .

Oligonucleotídeos para o gene β - actina foram utilizados como controle de qualidade do DNA extraído. As amostras foram avaliadas quanto a presença de HPV utilizando *nested* PCR com os oligonucleotídeos MY09/11 (externo) e GP5 +/6+ (interno).

Na primeira fase, foi utilizado o volume de 1 μ L do DNA extraído de cada paciente, 1 μ L MY09/11 (10 pmol cada) e 12 μ L de GoTaq Master Mix (Promega, USA). Água ultrapura foi utilizada em quantidade suficiente para completar o volume final de 25 μ L da reação de PCR. O programa de amplificação seguiu as seguintes especificações: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de extensão final de 10 min a 72°C e manutenção a 4°C. A *nested* PCR utilizou 5 μ L da primeira fase para preparação da segunda fase, ao qual foi adicionado 1 μ L GP5+/6+ (10 pmol de cada). Todos os demais itens foram adicionados na mesma especificação citada anteriormente.

A amplificação foi realizada com as seguintes especificações: 95°C por 2min e 40 ciclos de 95°C por 45 seg, 48°C durante 45 seg e 72°C por 45 seg. A extensão final foi de 10 min a 72°C com manutenção da amostra a 4°C. Os amplicons foram visualizados por corrida eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio como intercalador de DNA fita dupla com fluorescência sob luz ultravioleta. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo e o plasmídeo pBR322 do HPV16 foi utilizado como controle positivo da reação. Os resultados foram classificados como positivo, negativo e

indeterminado de acordo com a presença ou não de amplificação do HPV na amostra.

Dos prontuários das pacientes foram coletados os dados cadastrais e clínicos pela pesquisadora, anotados em questionário desenvolvido para este projeto. Neste questionário constam ainda dados referentes ao tratamento realizado e aos eventos, todos com registro da data da ocorrência. Os dados coletados foram digitados em questionário do programa Epi-info, versão 6.0 e em tabela do Excel (Microsoft Office).

4.6 Considerações éticas

A realização do estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Protocolo nº 023/2008). Por se tratar de um estudo retrospectivo de coleta de dados secundários de prontuários das pacientes, foi facultado o não preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.7 Análise estatística

As variáveis categóricas foram resumidas através de frequências absolutas e relativas. As variáveis numéricas, através de médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos. As associações entre variáveis categóricas foram avaliadas através do teste qui-quadrado. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para construir curvas de sobrevida para um ou mais grupos de pacientes. A comparação dessas curvas de sobrevida foi realizada

mediante o uso do teste Log-rank. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o software Stata 12.1SE.

5. RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1

SOBREVIDA E FATORES DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CÂNCER INVASIVO DO COLO UTERINO

Carla Limeira Barreto¹, Danyelly Bruneska Gondim Martins², José Luiz de Lima Filho², Vera Magalhães³.

Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.² Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.³

* Pré-formatado para submissão ao periódico *International Journal of Gynecology & Obstetrics*

Endereço para Correspondência:

Carla Limeira Barreto

Rua Jacobina, 45/1501, Graças

Recife – PE CEP 52011-180

e-mail: c_limeira@hotmail.com

Resumo

Objetivo Avaliar entre os fatores de prognóstico clínico-patológicos de mulheres com câncer invasivo do colo uterino, quais os mais importantes na evolução da doença.

Método Estudo retrospectivo que incluiu 344 pacientes com câncer do colo uterino estadio IA a IV, de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), tratadas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009. Destas, 272 foram tratadas com cirurgia, radioterapia ou quimioradioterapia com uso da cisplatina.

Resultados Em mais de 77% das pacientes o estágio clínico da doença era avançado (FIGO \geq IIB). A média de idade foi de 52 anos, com predomínio do carcinoma epidermóide (86%). A maioria das pacientes foi submetida a tratamento radioterápico exclusivo.

Conclusões O estadiamento clínico foi o único fator de prognóstico independente estatisticamente significante. O tempo total de radioterapia e a quimioterapia combinada à quimioterapia não tiveram influência na resposta ao tratamento nem na sobrevida do grupo estudado.

Palavras-chave Câncer do colo uterino, prognóstico, sobrevida, radioterapia.

Introdução

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no mundo são diagnosticados cerca de 450.000 casos novos de câncer do colo uterino por ano, com previsão de 240.000 óbitos por esta doença [1]. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são esperados 17 casos novos para cada 100.000 mulheres em 2012 [2]. A incidência do câncer do colo uterino é cerca de duas vezes maior em países em desenvolvimento quando comparada aos países desenvolvidos [2].

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e principalmente a persistência viral estão relacionadas com o aparecimento e a evolução do câncer invasivo do colo uterino [3,4]. Mulheres com início de atividade sexual e primeira gestação precoces, com múltiplos parceiros e com parceiros promíscuos têm um risco elevado para o desenvolvimento desta neoplasia [5].

O exame clínico representa a base para o diagnóstico e estadiamento de acordo com a *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO). Fazem parte do estadiamento apenas os achados do exame clínico, das radiografias de tórax e do esqueleto e da pielografia intravenosa, enquanto que os encontrados na cirurgia e detectados por outros exames de imagem, como: ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética não devem ser considerados para mudança do estadiamento [6].

Os fatores de risco para evolução da neoplasia do colo uterino incluem tamanho tumoral, estadiamento clínico (EC), subtipo histológico, envolvimento linfonodal e do espaço linfovascular [7].

O tratamento do câncer do colo uterino envolve o tratamento da lesão primária e das metástases. A cirurgia é limitada às pacientes com estágio inicial (I-II). Em estágios mais avançados, a radioterapia concomitante à quimioterapia baseada em platina confere aumento das taxas de sobrevida e da sobrevida livre de doença [8,9,10].

O objetivo deste estudo foi avaliar dentre fatores clínicos, histológicos e tratamento realizado, quais apresentaram relação com a resposta ao tratamento e a evolução do câncer invasivo do colo uterino.

Material e Métodos

Após aprovação pelo Comitê de Ética (Nº 023/2008), realizou-se estudo retrospectivo que incluiu 344 pacientes com câncer invasivo do colo uterino, atendidas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009 no Centro de Oncologia da Universidade de Pernambuco. Todas as pacientes foram submetidas a exame clínico e ginecológico completo, realização de hemograma, bioquímica, eletrocardiograma, radiografia de tórax, ultrassonografia de abdome e biópsia do tumor para definição histológica. As pacientes foram estadiadas de acordo com as diretrizes da FIGO.

De 344 pacientes, 272 (79,1%) realizaram tratamento oncológico. As outras setenta e duas mulheres não realizaram tratamento proposto, sessenta e quatro por abandono e oito por falta de condição clínica para o tratamento. Das pacientes tratadas, 248 pacientes realizaram radioterapia, seja como forma exclusiva, combinada à quimioterapia ou como tratamento pré e/ou pós-operatório. A radioterapia externa (RT) convencional bidimensional da pelve foi realizada por acelerador linear com energia nominal de 6MV, na dose média de

45 Gy, com frações diárias de 1.8 a 2.0 Gy, com média de oito semanas de tratamento. Foram administrados quatro campos isocêntricos de tratamento diariamente, calculados com o objetivo de englobar todo o volume tumoral e os linfonodos da região pélvica, monitorando os órgão de risco, sobretudo reto e bexiga para não ultrapassar a dose de tolerância dessas estruturas. A braquiterapia intracavitária de alta taxa de dose com fonte de iridium 192 foi iniciada geralmente na terceira semana de radioterapia, com uma ou duas aplicações semanais de 6 a 7 Gy e dose média de 26 Gy.

Quimioterapia concomitante a radioterapia com uso de platina foi realizada por 44 pacientes. Os esquemas utilizados foram: cisplatina 70 mg/m² no primeiro dia, associada ao fluorouracil 1000 mg/m² por 96 horas, a cada 21 dias (média de 2,2 ciclos por paciente) e cisplatina 40 mg/m² semanal (média de 4,4 ciclos por paciente), ambos os esquemas iniciados no primeiro dia de radioterapia. Duas pacientes fizeram tratamento quimioterápico paliativo com uso de cisplatina e fluorouracil nas doses acima descritas.

Ao término do tratamento a resposta foi definida como completa (RC) na ausência de doença clínica, radiológica e histológica e resposta não completa (RNC) quando havia lesão residual ou progressão de doença. Os dados foram censurados em 31 de dezembro de 2009 ou no último dia de atendimento da paciente.

Como fatores prognósticos foram avaliados: idade, tipo histológico, grau histológico, tempo e tipo do tratamento oncológico realizado. A sobrevida global foi calculada a partir da data da primeira consulta. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para construir as curvas de sobrevida. A comparação dessas

curvas de sobrevida foi realizada mediante o uso do teste Log-rank. As análises estatísticas foram realizadas com o software Stata 12.1SE.

Resultados

Nas 344 pacientes com câncer do colo uterino, a idade média foi $52,8 \pm 14$ anos, sendo que 284 pacientes tinham mais de 40 anos (82,6%). Houve o predomínio do carcinoma escamoso, que acometeu 296 (86%) dos casos, seguido do adenocarcinoma em 34 (9,9%) e outros tipos histológicos em menos de 4,1% dos casos. O tumor era medianamente ou mal diferenciado em 58,5% das biópsias realizadas e em 31% delas não havia definição do grau histológico. O estadio clínico (EC) era avançado (FIGO \geq IIB) em mais de 77% das pacientes (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de frequência de idade, histologia, grau histológico e estadiamento em mulheres com câncer invasivo do colo uterino.

Características	n(%)
Idade em anos	
≤ 39	60(17,4)
40 a 54	136(39,5)
≥ 55	148(43)
Tipo histológico	
CEC	296(86.0)
Adenocarcinoma	34(9.9)
Outros	14(4.1)
Grau histológico	
I	36(10.5)
II	143(41.6)
III	58(16.9)
Não classificado	107(31.1)
Estadiamento	
IA/IB	61 (17.7)
IIA/IIIB	86 (25)
IIIA/IIIB	177 (51.5)
IVA/IVB	20 (5.8)

O tempo de seguimento teve uma mediana de 1,5 anos e 9,9 anos foi o valor máximo do acompanhamento realizado. Duzentas e setenta e duas pacientes realizaram tratamento oncológico. Destas, 72 foram submetidas a cirurgia, 62% do EC I e 38% do EC II. Radioterapia foi realizada por 248 pacientes, sendo 159 tratadas com radioterapia exclusiva (46%). Quimioterapia concomitante à radioterapia com uso de cisplatina isolada ou associada ao fluorouracil foi utilizada em 44 pacientes. Duas pacientes com doença metastática receberam quimioterapia paliativa com uso de cisplatina e fluorouracil.

Com uma mediana de 50 dias após término do tratamento, 258 pacientes retornaram para avaliação da resposta: 196 (76%) foram classificadas como resposta completa e 62 (24%) tinham doença residual local ou metástase à distância. Nos dados clínicos analisados, apenas o estadiamento clínico teve associação com a resposta encontrada após o tratamento oncológico ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Associação entre idade, tipo histológico, grau histológico, estadiamento e resposta em pacientes com câncer invasivo do colo uterino.

	Resposta		Total	Valor p*
	Completa n(%)	Incompleta n(%)		
Idade				0.725
≤ 39	33(71.7)	13(28.3)	46(100.0)	
40 a 54	84(77.8)	24(22.2)	108(100.0)	
≥ 55	79(76.0)	25(24.0)	104(100.0)	
Total	196(76.0)	62(24.0)	258(100.0)	
Tipo histológico				0.978
CEC	170(75.9)	54(24.1)	224(100.0)	
Adenocarcinoma	22(75.9)	7(24.1)	29(100.0)	
Outros	4(80.0)	1(20.0)	5(100.0)	
Total	196(76.0)	62(24.0)	258(100.0)	
Grau histológico				0.323
I	21(72.4)	8(27.6)	29(100.0)	
II	79(71.2)	32(28.8)	111(100.0)	
III	34(81.0)	8(19.0)	42(100.0)	
SI	62(81.6)	14(18.4)	76(100.0)	
Total	196(76.0)	62(24.0)	258(100.0)	
Estadiamento				< 0.001
IA/IB	51(96.2)	2(3.8)	53(100.0)	
IIA/IIB	56(80.0)	14(20.0)	70(100.0)	
IIIA/IIIB	89(70.6)	37(29.4)	126(100.0)	
IVA/IVB	0(0.0)	9(100.0)	9(100.0)	
Total	196(76.0)	62(24.0)	258(100.0)	

*Teste qui-quadrado de Pearson. O resultado do teste demonstrou evidência de associação entre estadiamento clínico e resposta ($p < 0,001$). Em relação à variável idade, tipo histológico e grau histológico, não houve evidência de associação com a resposta ao tratamento oncológico.

Apesar da maioria das pacientes apresentarem estadiamento clínico avançado (EC maior ou igual a IIB), aproximadamente 70% das mulheres estavam vivas aos cinco anos (IC95% 64,5 a 78,3) e 58% (IC95% 47,4 a 67,3) no nono ano do seguimento (Figura 1).

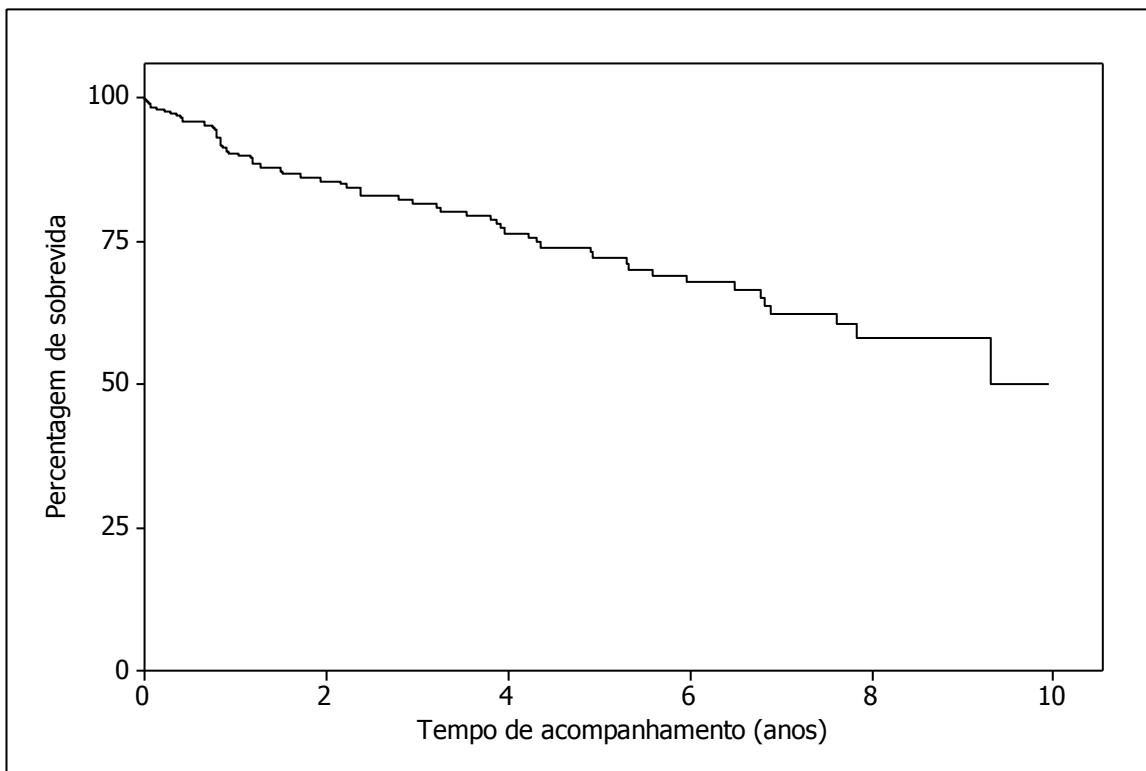


Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global das mulheres com câncer do colo uterino

O tempo de sobrevida livre de doença demonstrou que ao completar um ano da remissão do tumor, 60% (IC95% 48.2 a 75) das mulheres continuavam livres da doença. Aos cinco anos de remissão, apenas 8% (IC95% 2.6 a 17.9) delas ainda estavam livres da doença (Figura 2).

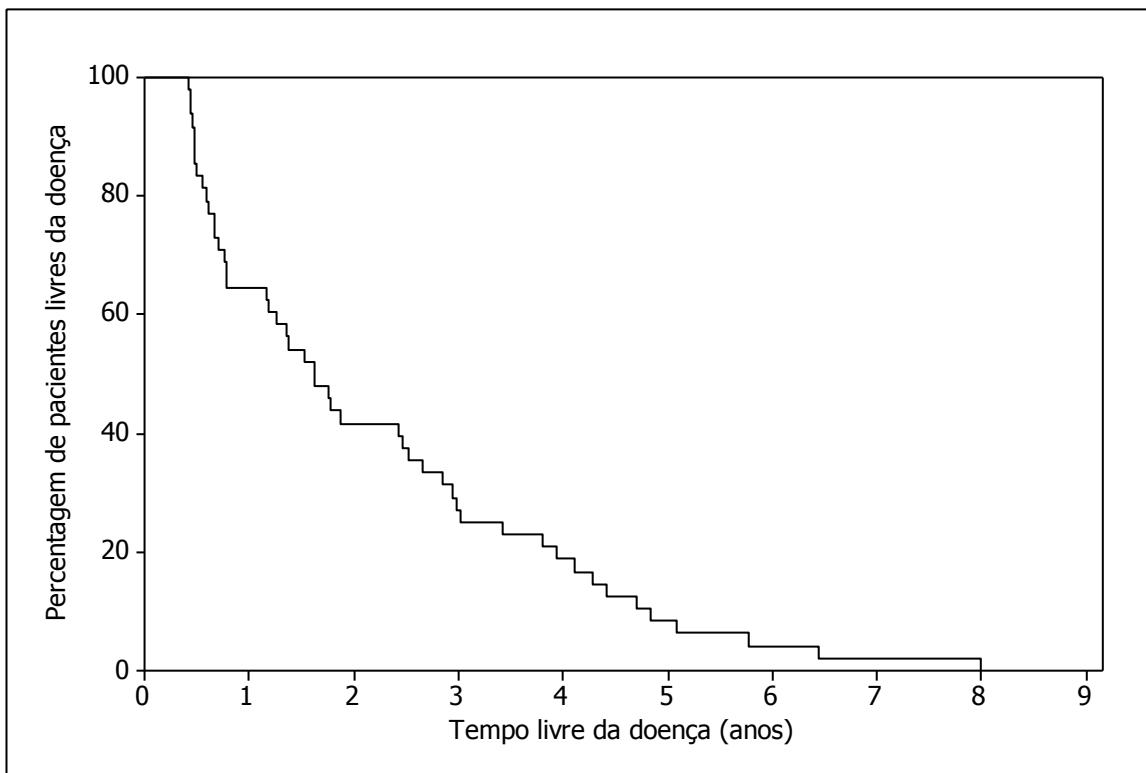


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida livre de doença (mulheres com resposta completa ao tratamento oncológico).

No grupo avaliado, nem o tempo total de radioterapia menor que 60 dias ou maior ou igual a 60 dias (teste do qui-quadrado $p= 0.885$), nem a associação de quimioterapia à radioterapia nos estadios II-IVA (teste do qui-quadrado $p= 0.960$), tiveram influência na resposta após o término do tratamento. Na análise de sobrevida, o resultado do teste log-rank não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo que realizou a radioterapia em menos de sessenta dias quando comparadas aquelas que fizeram o tratamento com duração acima deste período ($p= 0.789$) (Figura 3) e também nas pacientes que fizeram quimioterapia concomitante à radioterapia em relação às submetidas a tratamento radioterápico exclusivo ($p= 0.164$) (Figura 4).

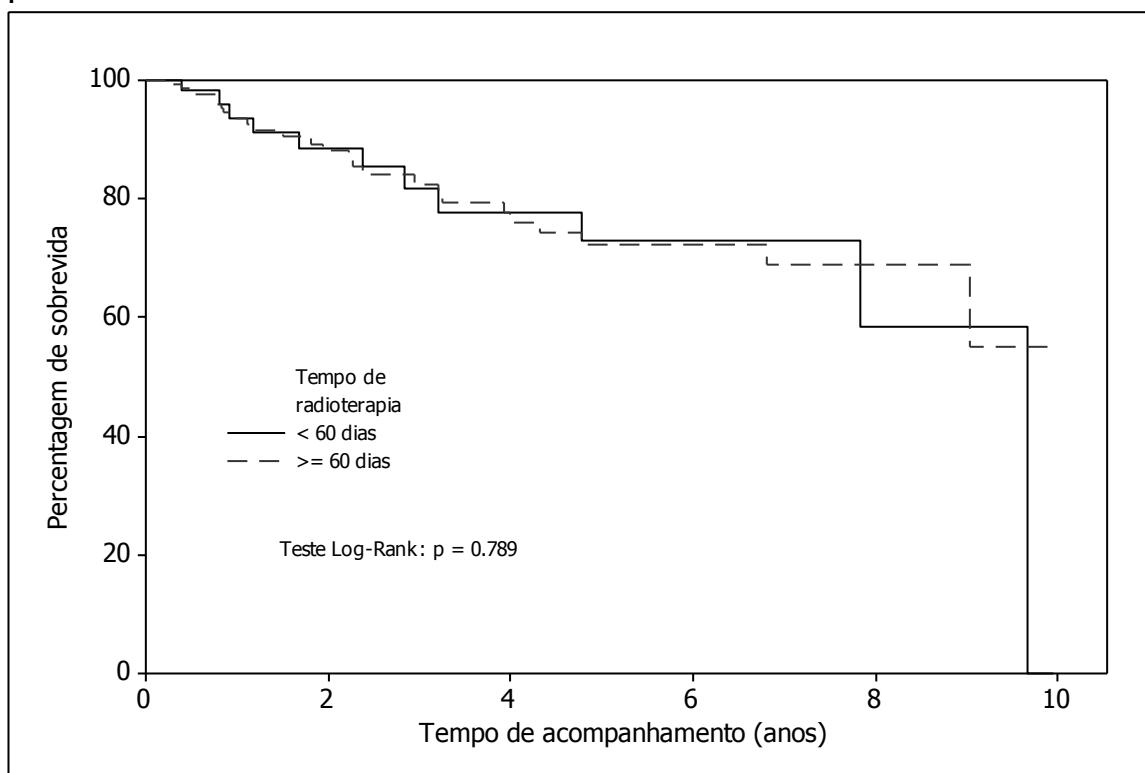


Figura 3. Curvas de sobrevida de pacientes com câncer do colo uterino, segundo o tempo de duração do tratamento radioterápico.

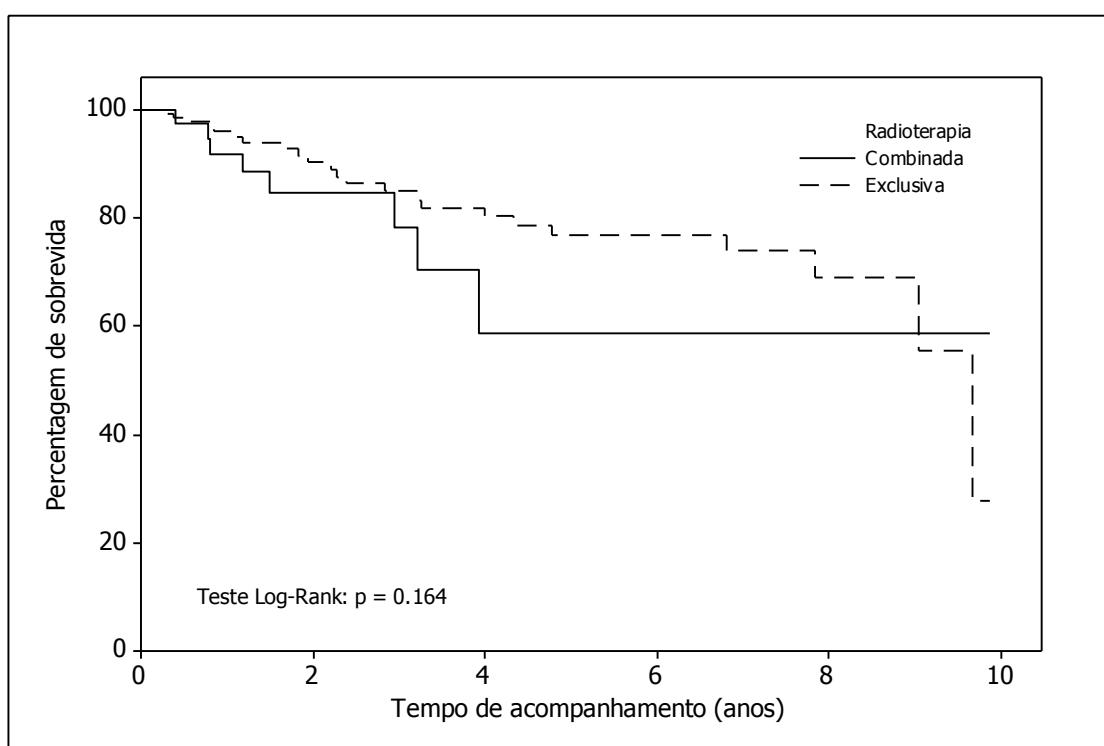


Figura 4. Curvas de sobrevida das mulheres com câncer do colo uterino estadio II a IVA, que se submeteram à radioterapia exclusiva ou combinada à quimioterapia.

A presença de um grande número de pacientes com estadiamento clínico avançado na ocasião do diagnóstico é esperada em países em desenvolvimento e esta variável foi a única que apresentou influência na sobrevida (Figura 5).

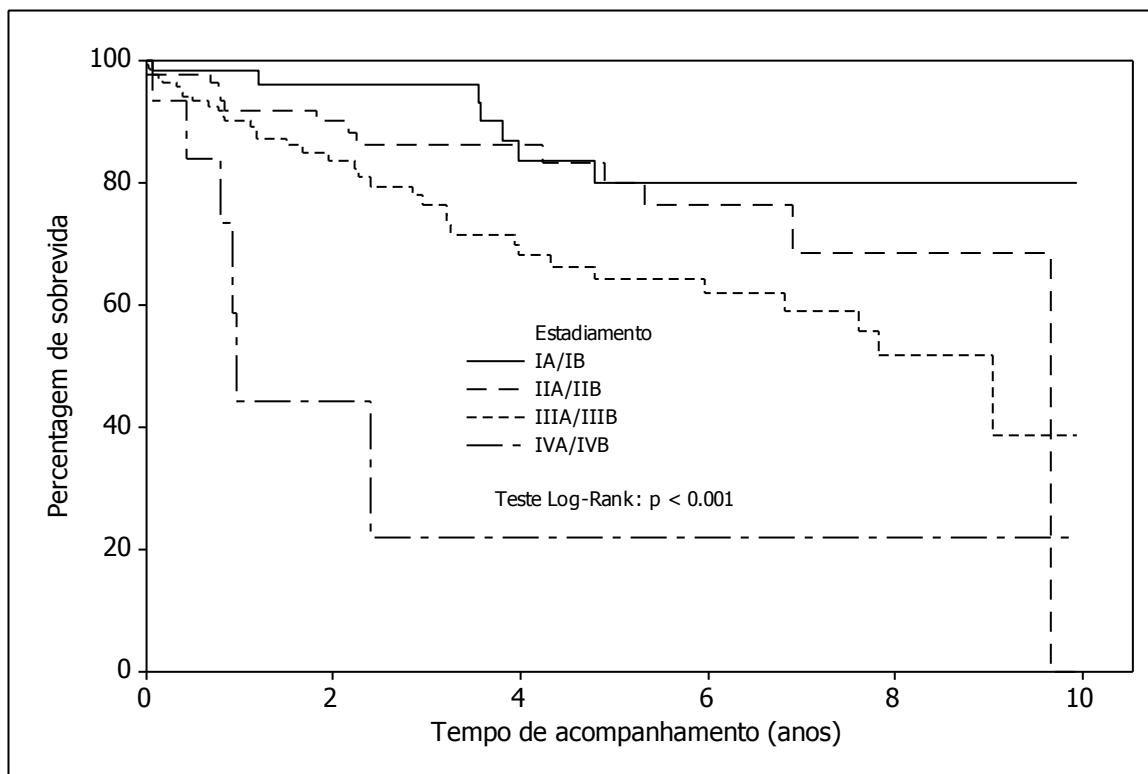


Figura 5. Curvas de sobrevida de pacientes com câncer do colo uterino, segundo o estadiamento clínico.

O resultado do teste log-rank ($p < 0.001$) indica que houve uma associação significante entre estadiamento clínico e sobrevida principalmente nas pacientes com doença avançada.

Discussão

Nesta série retrospectiva de 344 pacientes, a idade média, o predomínio do carcinoma epidermoide na histologia e do grau histológico intermediário, são semelhantes aos resultados descritos na literatura [5, 7,11]. Nenhuma destas variáveis apresentou interferência na evolução da doença, mesmo nas pacientes com adenocarcinoma, que seria considerado como fator de pior prognóstico [7]. O tratamento foi realizado por 272 pacientes, sendo realizada cirurgia em casos iniciais (EC \leq IIA) e radioterapia exclusiva ou combinada à quimioterapia nos tumores avançados (EC \geq IIB).

A radioterapia é a base do tratamento em pacientes com câncer avançado do colo uterino. O tempo total do tratamento radioterápico tem influência no controle local e na sobrevida global das pacientes, com descrição de perda de 1% do controle local por dia quando excedido 52 dias de tratamento e aumento de 5% para 10% da recorrência local quando comparados menos de seis com mais de 10 semanas de tratamento, principalmente em pacientes com EC III [12,13,14,15].

No grupo estudado, não foram observadas diferenças significativas quanto à frequência de resposta completa ao tratamento ($p=0,885$), nem quanto à sobrevida ($p = 0,789$), quando comparados os grupos que realizaram radioterapia por períodos superiores ou inferiores a 60 dias. Vale ressaltar que o tempo prolongado da radioterapia no estudo (mediana 69 dias) não é consequência de uma maior dose de radioterapia utilizada, mas sim na dificuldade de locomoção das pacientes avaliadas.

Em um maior volume tumoral, o aumento da dose local de radioterapia excederia o limite de tolerância para toxicidade dos tecidos normais [16]. Com

o objetivo de potencializar o efeito da radioterapia, a adição da quimioterapia à radioterapia tem sido utilizada como tratamento neoadjuvante ou concomitante. No tratamento neoadjuvante, dois a quatro ciclos de quimioterapia são administrados antes da radioterapia, com objetivo de reduzir o tamanho tumoral. No tratamento concomitante, ambas as modalidades terapêuticas são iniciadas ao mesmo tempo. A adição da cisplatina de forma isolada ou associada a outra drogas como fluorouracil, mitomicina ou paclitaxel confere aumento na sobrevida global e na sobrevida livre de doença e se tornou o tratamento padrão [8,9,10,11,17,18]. Estes efeitos parecem ser maiores em pesquisas com uma grande proporção de pacientes em estágios iniciais [19]. Mais recentemente, um estudo com a adição da gemcitabina à cisplatina, obteve ganho significativo na sobrevida global ($p= 0,0224$) e na sobrevida livre de doença ($p= 0,0227$) em três anos, à custa de uma toxicidade manejável [20].

Mesmo com a descrição em literatura do ganho em sobrevida global e em sobrevida livre de doença com o uso concomitante de quimioterapia e radioterapia no câncer invasivo do colo uterino, apenas 44 pacientes realizaram tratamento combinado no período da pesquisa. No entanto, ao compararmos os resultados de resposta completa e de sobrevida nas pacientes com EC II-IVA, que se submeteram a radioterapia exclusiva ou ao tratamento combinado, verificamos resultados diferentes dos descritos na literatura, pois não houve diferença estatística ($p= 0,960$ e $p= 0,164$, respectivamente) entre os grupos avaliados.

Em conclusão, baseado nos nossos resultados, apenas o estadiamento clínico foi fator de prognóstico na evolução da doença, com significância estatística. As demais variáveis analisadas, como a idade, tipo e grau

histológico, duração e modalidade do tratamento oncológico não demonstraram associação com a resposta obtida ao término do tratamento inicial, nem com a sobrevida global das pacientes.

Referências

- [1] Agência Internacional para Pesquisa do Câncer. Estatística global do câncer, Organização Mundial da Saúde. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Publicado em 2008.
- [2] Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. <http://inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122011.pdf>. Publicado em 2011.
- [3] Lombard I, Salomon AV, Validire P, Zafrani B, Rochedordière A, Clough K et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(8): 2613-2619
- [4] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370(9590): 890-907.
- [5] Eifel PJ, Berek JS, Markman M. Cancer of the cervix, vagina , and vulva. In: DeVita JR VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 1311-1344.
- [6]. Pecorelli S, Ngan HYS, Hacker, NF, Denny L, Jones III HW, KavanaghJ et al. Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecological Cancers. FIGO. http://www.igo.org/files/igo-corp/docs/staging_booklet.pdf. Publicado em 2006.
- [7] Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M. Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21(5s): 37-40.
- [8] Morris M ,Eifel PJ, Lu J, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *New Engl J Med* 1999; 340(15): 1137-43.
- [9] 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. *New Engl J Med* 1999; 340(15): 1145-53.

- [10] Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *New Engl J Med* 1999; 340(15): 1154-61.
- [11] Petgnat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer. *BMJ* 2007; 335: 765-8.
- [12] Girinsky T, Rey A, Roche B, Haie C, Gerbaulet A, Randrianarivello H, ChassagneD. Overall treatment time in advanced cervical carcinomas: a critical parameter in treatment outcome. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1993; 27(5):1051-6.
- [13] Lanciano RM, Pajak TF, Martz K, Hanks GE. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1993; 25(3): 391-7.
- [14] Ota T, Takeshima N, Tabata T, Hasumi K, Takizawa K. Treatment of squamous cell carcinoma of the uterine cervix with radiation therapy alone: long-term survival, late complications, and incidence of second cancers. *Brit J Cancer* 2007; 97(8): 1058-1062.
- [15] Barbera L, Thomas G. Management of early and advanced cervical cancer. *Semin Oncol* 2009; 36:155-169.
- [16] Rose PG. Combined-modality therapy of locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(10s): 211s-217s.
- [17] Vale C, Tierney JF, Stewart, Brady M, Dinshaw K, Jakobsen A et al. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: individual patient data meta-analysis (Review). The Cochrane Collaboration. New Jersey: JohnWiley & Sons,Ltd; 2010: 1-43.
- [18] Movva S, Rodriguez L, Arias-Pulido H, Verschraegen C. Novel chemotherapy approaches for cervical cancer. *Cancer* 2009; 115: 3166-80.
- [19] Green JA, Kirwan Jj, Tierney J, Vale CL, Symonds PR, Fresco LL et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix (Review). The Cochrane Collaboration. New Jersey: JohnWiley & Sons,Ltd; 2010: 1-51.
- [20] Duenas-Gonzalez A, Zarbá JJ, Patel F, Alcedo JC, Beslija S, Casanova L et al. Phase III, open-label, randomized study comparing concurrent gemcitabine plus cisplatin and radiation followed by adjuvant gemcitabine and cisplatin versus concurrent cisplatin and radiation in patients with stage IIB to IVA carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2011; 29(13): 1678-85.

5.2 ARTIGO 2

DETECÇÃO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM BIÓPSIAS DE PACIENTES COM CÂNCER DA CÉRVICE UTERINA E ASSOCIAÇÃO COM PROGNÓSTICO.

Carla Limeira Barreto¹, Danyelly Bruneska Gondim Martins², José Luiz de Lima Filho², Vera Magalhães³.

Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.² Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.³

Pré-formatado para submissão ao periódico *Archives of Gynecology and Obstetrics*

Endereço para Correspondência:
Carla Limeira Barreto
Rua Jacobina, 45/1501, Graças
Recife – PE CEP 52011-180
e-mail: c_limeira@hotmail.com

Resumo

Objetivo Avaliar a detecção do Papilomavírus humano (HPV) em biópsias do colo uterino e a sua relação com a resposta clínica e a sobrevida de pacientes com câncer da cérvice uterina.

Método A presença do HPV foi determinada pela reação em cadeia da polimerase (*nested* PCR) do material de 183 blocos de parafina contendo biópsias de pacientes com câncer da cérvice uterina. As diretrizes da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) foram utilizadas para o estadiamento clínico dos casos. A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas foram calculadas pelo teste de log-rank.

Resultados A amplificação resultou positiva em 78 casos, negativa em 96 e indeterminada em nove casos. A detecção do HPV não teve influência estatisticamente significante na sobrevida das pacientes.

Conclusões Dentre as variáveis analisadas, apenas o HPV positivo e o estadiamento clínico influenciaram na obtenção de resposta completa ao término do tratamento. No entanto, o estadiamento clínico foi o único fator que teve associação com a evolução da doença, com pacientes no estadio inicial apresentando os melhores resultados na sobrevida global ($p < 0,001$).

Palavras-chave Câncer invasivo da cérvice uterina, HPV, PCR, prognóstico.

Introdução

O câncer da cérvice uterina é o segundo tumor maligno mais frequente e o terceiro em causa de morte por câncer no sexo feminino, representando 8% dos casos de óbito por câncer neste sexo no mundo [1]. Em países desenvolvidos, sua mortalidade vem caindo nas últimas décadas, em virtude da prevenção secundária obtida com os testes de triagem como o Papanicolau [2,3]. A associação direta do aparecimento desta neoplasia com a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é bem conhecida. Mais de 100 subtipos de HPV foram descritos até o momento e em geral a infecção do trato genital causada pelo vírus regredie espontaneamente, sem nenhum tipo de tratamento [4,5]. A persistência do HPV por seis meses ou mais é encontrada em pacientes mais velhas, naquelas com infecção por múltiplos subtipos virais e com subtipos de maior potencial oncogênico, destacando-se os subtipos virais 16 e 18 [6]. Em pacientes com câncer da cérvice uterina, a ausência da detecção do vírus no tumor, o subtipo viral e a presença do DNA do HPV em linfonodos livres de neoplasia são considerados como fatores de mau prognóstico [7,8,9]. No que diz respeito ao tratamento desta neoplasia, não houve grandes mudanças nos últimos anos e consiste em cirurgia nos estágios iniciais, com a radioterapia ou a quimioterapia combinada à radioterapia reservada para tumores iniciais de alto risco ou em doença avançada [10].

Material e Métodos

Dados clínico-patológicos

A população avaliada foi composta de 183 pacientes com carcinoma invasivo da cérvix uterina, tratadas no Centro de Oncologia da Universidade de Pernambuco. Este grupo representa 53% do total de mulheres com esta doença atendidas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2009 e é formado por pacientes cujas biópsias, realizadas antes do tratamento oncológico e incluídas em blocos de parafina, foram disponibilizadas. As diretrizes da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) foram utilizadas para o estadiamento clínico (EC) das pacientes, sendo o EC III o mais frequente (48%). Além do estadiamento clínico e da pesquisa do HPV, foram analisadas em relação à evolução da doença as seguintes variáveis: idade, tipo histológico e grau histológico. Cento e quarenta e três pacientes realizaram tratamento oncológico, sendo que 41 delas foram submetidas a cirurgias e 120 (65%) receberam radioterapia externa na dose de 49 Gy em oito semanas, com em média quatro inserções de braquiterapia na dose de 27 Gy. Vinte e duas pacientes realizaram quimioterapia concomitante à radioterapia, com uso de cisplatina semanal de 40mg/m² ou cisplatina 70mg/m² D1 e fluorouracil 1000mg/m² D1 a D4, a cada 21 dias. Foram consideradas como resposta completa (RC) as pacientes que na reavaliação clínica, histológica e em exames de imagem realizados ao final do tratamento não apresentavam doença local ou à distância e resposta incompleta (RI) quando havia doença residual ou metastática.

O teste do qui-quadrado foi utilizado na análise das associações entre variáveis categóricas. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier. A comparação destas curvas foi realizada mediante o uso do teste Log-Rank e adotado o nível de significância de 0.05. As análises

estatísticas foram realizadas com o software Stata 12.1SE. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética da instituição.

Pesquisa viral

Blocos de parafina contendo tecido cervical foram submetidos a cortes de 3 a 5 μm . Ao tecido parafinado foi adicionado xileno para remoção da parafina e posteriormente etanol 100% foi utilizado para retirar os traços de xileno do tecido trabalhado. O etanol foi seco ao ar livre e o tecido homogeneizado com 20 μL de SDS 20%, 80 μL tampão (NaCl 0,375 M, EDTA 0.12 M, pH 8.0), e 40 μL de proteinase K (10 mg/mL). Água esterilizada foi adicionada para o volume final de 380 μL . O tubo contendo a reação foi incubado a 55°C por 16 horas. Posteriormente, 100 μL de NaCl 6M foi adicionado à amostra para precipitação das proteínas por centrifugação à 10.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foi adicionado 1 mL de etanol a 100%. A amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 5 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 70% e evaporado ao ar livre. Finalmente, o precipitado foi suspenso em 50 μL de tampão TE (Tris-Cl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e estocado a menos 20°C até a realização do teste molecular [11].

Oligonucleotídeos para o gene β - actina foram utilizados como controle de qualidade do DNA extraído. As amostras foram avaliadas quanto a presença de HPV utilizando *nested* PCR com os oligonucleotídeos MY09/11 (externo) e GP5 +/6+ (interno) [12,13].

Na primeira fase, foi utilizado o volume de 1 μL do DNA extraído de cada paciente, 1 μL MY09/11 (10 pmol cada) e 12 μL de GoTaq Master Mix (Promega, USA). Água ultrapura foi utilizada em quantidade suficiente para

completar o volume final de 25 μ L da reação de PCR. O programa de amplificação seguiu as seguintes especificações: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de extensão final de 10 min a 72°C e manutenção a 4°C. A *nested* PCR utilizou 5 μ L da primeira fase para preparação da segunda fase, ao qual foi adicionado 1 μ L GP5+/6+ (10 pmol de cada). Todos os demais itens foram adicionados na mesma especificação citada anteriormente.

A amplificação foi realizada com as seguintes especificações: 95°C por 2min e 40 ciclos de 95°C por 45 seg, 48°C durante 45 seg e 72°C por 45 seg. A extensão final foi de 10 min a 72°C com manutenção da amostra a 4°C. Os amplicons foram visualizados por corrida eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio como intercalador de DNA fita dupla com fluorescência sob luz ultravioleta. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo e o plasmídeo pBR322 do HPV16 foi utilizado como controle positivo da reação. Os resultados foram classificados como positivo ou negativo, de acordo com a presença ou não de amplificação do HPV na amostra. Indeterminado foi o termo utilizado nos casos em que houve amplificação viral, mas o controle da β -actina não foi positivo.

Resultados

A média de idade foi 53 anos, com predomínio do carcinoma escamoso como tipo histológico (87%). Em 36% das biópsias o tumor era medianamente diferenciado e em 37% não havia esta classificação. O grupo era semelhante quanto à procedência das pacientes (90 pacientes da região metropolitana e 93 oriundas do interior do estado). A pesquisa do Papilomavírus humano resultou

positiva em 78 biópsias, negativa em 96 e indeterminada em nove biópsias. Não houve associação entre as variáveis estudadas e o resultado da pesquisa do HPV (Tabela 1).

Tabela 1. Associações entre variáveis clínicas, demográficas e HPV em pacientes com câncer da cérvice uterina.

	HPV			Total	Valor p [*]
	Positivo n(%)	Negativo n(%)	Indeterminado n(%)		
Idade					0.838
<50	36(45.0)	40(50.0)	4(5.0)	80(100.0)	
≥50	42(40.8)	56(54.4)	5(4.9)	103(100.0)	
Total	78(42.6)	96(52.5)	9(4.9)	183(100.0)	
Procedência					0.127
Região					
Metropolitana	32(35.6)	52(57.8)	6(6.7)	90(100.0)	
Interior	46(49.5)	44(47.3)	3(3.2)	93(100.0)	
Total	78(42.6)	96(52.5)	9(4.9)	183(100.0)	
Estadiamento					0.920
IA/IB	18(46.2)	19(48.7)	2(5.1)	39(100.0)	
IIA/IIB	18(42.9)	21(50.0)	3(7.1)	42(100.0)	
IIIA/IIIB	38(42.7)	48(53.9)	3(3.4)	89(100.0)	
IVA/IVB	4(30.8)	8(61.5)	1(7.7)	13(100.0)	
Total	78(42.6)	96(52.5)	9(4.9)	183(100.0)	
Tipo histológico					0.180
CEC	69(43.1)	85(53.1)	6(3.8)	160(100.0)	
Adenocarcinoma	8(50.0)	6(37.5)	2(12.5)	16(100.0)	
Outros	1(14.3)	5(71.4)	1(14.3)	7(100.0)	
Total	78(42.6)	96(52.5)	9(4.9)	183(100.0)	
Grau histológico					0.760
I	4(26.7)	10(66.7)	1(6.7)	15(100.0)	
II	30(45.5)	33(50.0)	3(4.5)	66(100.0)	
III	14(40.0)	18(51.4)	3(8.6)	35(100.0)	
SI	30(44.8)	35(52.2)	2(3.0)	67(100.0)	
Total	78(42.6)	96(52.5)	9(4.9)	183(100.0)	

*Teste qui-quadrado de Pearson. O resultado do teste qui-quadrado não mostrou evidência de associação entre as variáveis e o resultado do HPV.

A mediana do seguimento do grupo estudado foi de 1,6 anos, com 15% das pacientes sendo acompanhadas por mais de 5 anos. Cento e quarenta e

três pacientes (78%) se submeteram a tratamento oncológico e destas 131 (92%) foram avaliadas quanto à resposta ao tratamento. Neste aspecto, o resultado positivo do HPV e o estadiamento clínico foram os únicos fatores que tiveram associação com a resposta encontrada ao término do tratamento (Tabela 2).

Tabela 2. Associação entre idade, tipo histológico, grau histológico, estadiamento e resposta ao término do tratamento oncológico em pacientes com câncer do colo uterino.

	Resposta		Total	Valor p
	Completa N(%)	Incompleta N(%)		
Idade				0.514
< 50	48(77.4)	14(22.6)	62(100.0)	
≥ 50	50(72.5)	19(27.5)	69(100.0)	
Total	98(74.8)	33(25.2)	131(100.0)	
Tipo histológico				0.934
CEC	86(74.8)	29(25.2)	115(100.0)	
Adenocarcinoma	10(76.9)	3(23.1)	13(100.0)	
Outros	2(66.7)	1(33.3)	3(100.0)	
Total	98(74.8)	33(25.2)	131(100.0)	
Grau histológico				0.456
I	8(72.7)	3(27.3)	11(100.0)	
II	33(67.3)	16(32.7)	49(100.0)	
III	21(80.8)	5(19.2)	26(100.0)	
SI	36(80.0)	9(20.0)	45(100.0)	
Total	98(74.8)	33(25.2)	131(100.0)	
HPV				* 0.015
Positivo	50(84.7)	9(15.3)	59(100.0)	
Negativo	42(65.6)	22(34.4)	64(100.0)	
Indeterminado	6(75.0)	2(25.0)	8(100.0)	
Total	98(74.8)	33(25.2)	131(100.0)	
Estadiamento				< 0.001
IA/IB	31(93.9)	2(6.1)	33(100.0)	
IIA/IIB	26(78.8)	7(21.2)	33(100.0)	
IIIA/IIIB	41(69.5)	18(30.5)	59(100.0)	
IVA/IVB	0(0.0)	6(100.0)	6(100.0)	
Total	98(74.8)	33(25.2)	131(100.0)	

* Comparação da resposta completa entre HPV positivo e HPV negativo. Teste qui-quadrado de Pearson . O HPV positivo e o estadiamento clínico apresentaram uma associação estatisticamente significante com a resposta ao término do tratamento.

O gráfico de sobrevida mostra que, ao completar cinco anos de acompanhamento, cerca de 60% das pacientes (IC95% 51.8 a 73.1) e ao término da pesquisa, metade das pacientes estava viva (IC95% 39.5 a 65.1) (Figura 1).

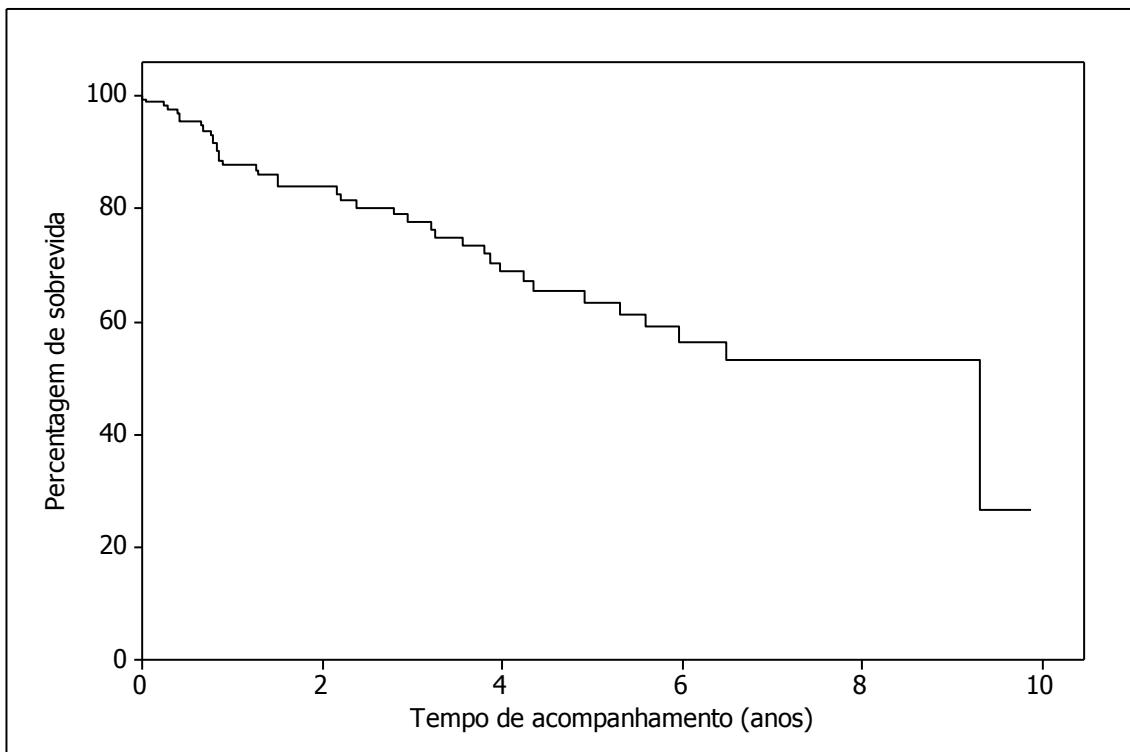


Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida global em pacientes com câncer da cérvix uterina.

O resultado positivo encontrado pela reação em cadeia da polimerase sobre a presença do Papilomavírus humano (HPV) nas biópsias em parafina do colo uterino não teve influência na sobrevida global das pacientes (Figura 2).

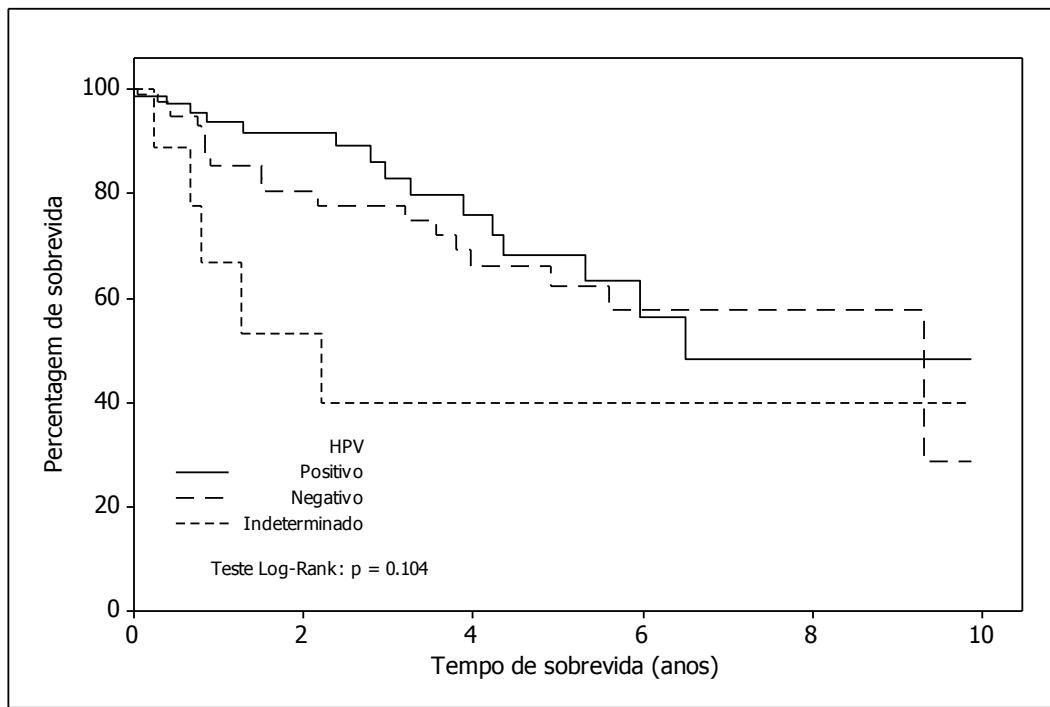


Figura 2. Curvas de sobrevida segundo o resultado do HPV em mulheres com câncer do colo uterino.

Nas curvas de sobrevida de acordo com o estadiamento clínico, os estádios III e IV mostraram um pior desempenho. A associação do estadiamento clínico com a sobrevida foi estatisticamente significante ($p < 0,001$) (Figura 3).

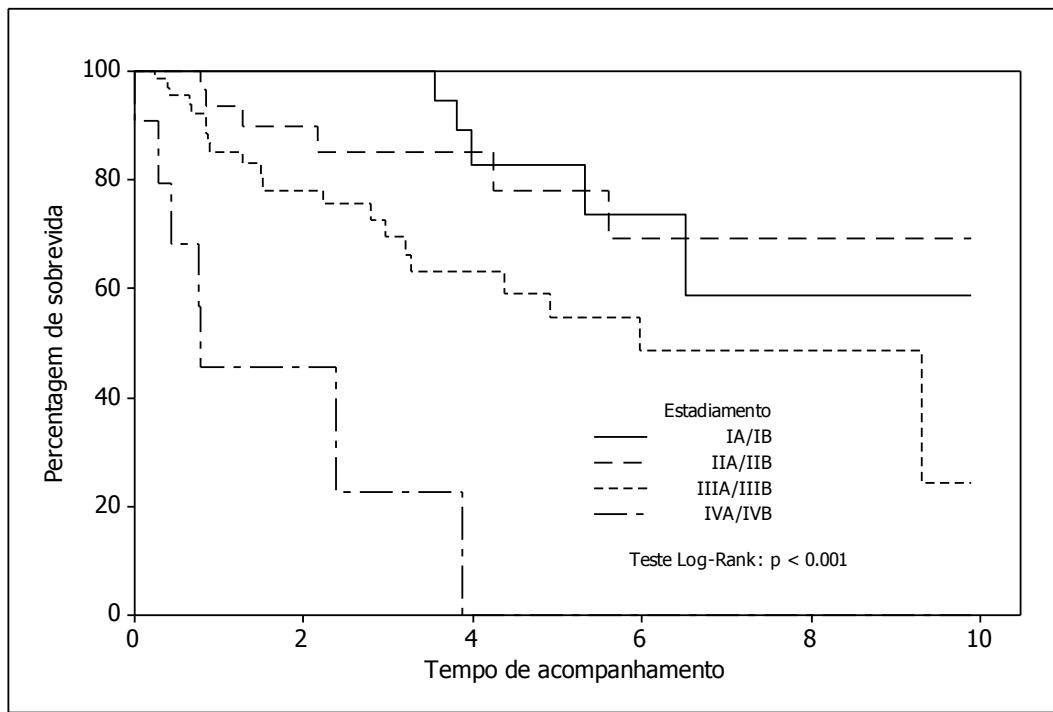


Figura 3. Curva de Kaplan Meier, segundo o estadiamento clínico, em pacientes com câncer da cérvice uterina.

Discussão

Ao se avaliar o prognóstico do câncer da cérvice uterina, alguns fatores clínico-patológicos e epidemiológicos fazem parte do painel comum pesquisado. É o caso da idade, tabagismo, tipo histológico, grau histológico, tamanho tumoral, invasão linfática, presença e subtipo do HPV detectado e até o tipo e a forma do tratamento realizado [14,15]. Neste estudo, inicialmente avaliamos os dados referentes à idade, tipo e grau histológico e procedência das pacientes em relação à amplificação do HPV e posteriormente à resposta clínica. Nos resultados obtidos nenhuma destas variáveis teve associação com a detecção do vírus ou a evolução da doença.

Por se tratar de uma doença sexualmente transmissível, associada ao HPV, era esperado que o vírus fosse mais encontrado nas biópsias de pacientes oriundas dos grandes aglomerados urbanos, ou seja, oriundas da capital e região metropolitana. No entanto, não houve associação significativa da região de origem da paciente com o resultado da PCR para pesquisa do HPV.

Em pacientes com câncer do colo uterino, a pesquisa do HPV em biópsias de tecido fresco do colo, resultam na detecção e subtipagem viral em cerca de 90% dos casos [16-19]. Apesar da descrição de uma detecção viral maior em alguns estudos que investigaram a presença do vírus em biópsias de parafina, a amplificação viral detectável no nosso estudo só se tornou possível em 78 casos (43%) com o emprego da *nested* PCR [20]. Neste caso, uma justificativa para esta dificuldade, pode ter sido o tempo decorrido entre a coleta do material e a realização do exame, ou fatores técnicos, como o condicionamento das biópsias e a qualidade do material de inclusão (parafina). Entretanto, essa dificuldade foi em parte compensada pela realização da *nested* PCR, método mais sensível que a PCR tradicional.

À semelhança do que é descrito em relação ao carcinoma de cabeça e pescoço, a ausência do Papilomavírus humano em biópsias do colo uterino é também relacionada com mau prognóstico [8,9,21]. No nosso estudo, apenas em relação ao término do tratamento, o HPV positivo ($p= 0,51$) teve associação com a resposta completa. Quando avaliamos em relação às curvas de sobrevida, a detecção viral não teve influência no desenrolar da doença. O estadiamento clínico estabelecido na avaliação inicial foi o único a ter associação com a sobrevida da paciente.

Em conclusão, dentre os fatores de prognóstico avaliados, apenas a presença do HPV e o estadiamento clínico avançado influenciaram na resposta clínico-patológica obtida ao término do tratamento, enquanto que na análise de sobrevida , o estadiamento foi o único fator implicado na evolução da doença.

Referências

1. Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (2008). Estatística global do câncer, Organização Mundial da Saúde. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Acessado em 10 janeiro 2012
2. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (2011) Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. <http://inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122011.pdf>. Acessado em 10 janeiro 2012
3. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. (2011) Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet 378:1461-1484.
4. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (2002). Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento. <http://www.febrasgo.org.br/arquivos/diretrizes/079.pdf>. Acesso em 16 jun 2010
5. Hellner K, Munger K (2011) Human Papilomaviruses as therapeutic targets in human cancer. J Clin Oncol 29: 1785-1794
6. Ho GYF, Bierman R, Beardsley NP, Chang CJ, Burk RD (1998) Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med 338(7): 423-428
7. Higgins GD, Uzelin DM, Philips GE, Davy M, Roder D, Burrell CJ (1991) Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus. Lancet 338(8772): 910-913
8. Riou G, Bourhis J, Favre M, Orth G, Jeannel D, Le Doussal V (1990) Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. Lancet 335(8699); 1171-1174
9. Eifel PJ, Berek JS, Markman M. Cancer of the cervix, vagina , and vulva. In: DeVita JR VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 1311-1344.

10. Ota T, Takeshima N, Tabata T, Hasumi K, Takizawa K (2007) Treatment of squamous cell carcinoma of the uterine cervix with radiation therapy alone: long-term survival, late complications, and incidence of second cancers. *Brit J Cancer* 97(8): 1058-1062
11. Husman AMR, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF (1995) The use of general primers GP5 and GP elongated at their 3'ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76: 1057-1062
12. Haws ALF, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK et al. (2004) Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5⁺ / 6⁺ prime sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 122: 87-93
13. Khan S, Jaffer NN, Khan MN, Rai MA, Shafiq M, Ali A et al. (2007) Human papillomavirus subtype 16 is common in Pakistani women with cervical carcinoma. *IJID* 11:313-317
14. Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M (2010) Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21(5s): 37-40.
15. Cooke SL, Temple J, MacArthur S, Zahra MA, Tan LT, Crawford RAF et al. (2011) Intra-tumor genetic heterogeneity and poor chemoradiotherapy response in cervical cancer. *B J Cancer* 104: 361-368
16. Howell-Jones R, Bailey A, Beddows S, Sargent A, Silva N, Wilson G et al. (2010) Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. *BJC* 103: 209-216
17. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferency A et al. (2007) Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 357(16): 1579-1588
18. Huang HJ, Huang SL, Lin CY, Lin RW, Chao FY, Chen MY et al. (2004) Human papillomavirus genotyping by polymerase chain reaction-based genechip method in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery. *Int J Gynecol Cancer* 14:639-649
19. Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B et al. (2007) Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 122: 428-432
20. Huang LW, Chao SL, Hwang JL (2004) Human Papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer* 100(2): 327-334
21. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008) Improved survival for patients with human

papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst 100: 261-269

6. CONCLUSÕES DA TESE

- Dentre os parâmetros clínico-patológicos estudados como fatores de prognóstico no câncer do colo uterino, apenas o estadiamento clínico teve relação com a evolução da doença.
- A pesquisa através da reação em cadeia da polimerase (PCR) do Papilomavírus humano detectou a presença do vírus em 78 (43%) de 183 biópsias de parafina pesquisadas.
- A idade, tipo e grau histológico não tiveram relação com a resposta ao tratamento, nem com a evolução da doença.
- A resposta completa ao término do tratamento para pacientes com câncer invasivo do colo uterino teve relação apenas com a presença do HPV e o estadiamento clínico avançado.
- Em relação ao tratamento, o tempo total do tratamento radioterápico e a combinação de quimioterapia à radioterapia não tiveram influência na sobrevida do grupo estudado.

7. REFERÊNCIAS DA TESE

1. AGÊNCIA INTERNACIONAL PARA PESQUISA DO CÂNCER (2008) Estatística global do câncer, Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp..> Acesso em: 10 jan. 2012.
2. AZAR, K. K. et al. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum pathol*, Atlanta, v. 35, n.11, p.1376-1384, nov. 2004.
3. BARBERA, L.; THOMAS, G. Management of early and advanced cervical cancer. *Semin Oncol*, Filadélfia, v. 36, n.2, p. 155-169, abr. 2009.
4. BRANCA, M. et al. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol*, Chicago, v. 124, n. 1, p. 113-121, jul. 2005.
5. CRUM, D.; ABBOTT, D. W.; QUADE, B. J. Cervical cancer screening: from the Papanicolaou smear to the vaccine era. *J Clin Oncol*, Alexandria, v. 21, n.10s, p. 224s-230s, maio 2003.
6. EIFEL, P. J.; BEREK, J. S.; MARKMAN, M. A. Cancer of the cervix, vagina and vulva. In: DeVITA JR., V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: principles & practice of oncology. 9. ed. Philadelphia, Lippincott-Williams-Wilkins, 2011. p. 1311-44.
7. FARZANEH, F. et al. The IL-10 – 1082G polymorphism is associated with clearance of HPV infection. *BJOG*, Oxford, v. 113, n.8, p. 961-964, ago. 2006.
8. FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento, 11 set. 2002. Disponível em: <<http://www.febrasgo.org.br/arquivos/diretrizes/079.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2010.
9. FERNANDES, A. P. M. et al. HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology*, Atlanta, v. 334, n.2, p. 294-298, abr. 2005.
10. FREGNANI, J. H. T. G. et al. Fatores de risco não habituais para metástase linfonodal no câncer do colo do útero. *Rev Assoc Med Bras*, São Paulo, v. 53, n. 4, p. 338-343, jul.2007.
11. GIRINSKY, T. et al. Overall treatment time in advanced cervical carcinomas: a critical parameter in treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, Fairfax, v. 27, n. 5, p. 1051-56, dez. 1993.

12. GREEN, J. A. et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix (Review). The Cochrane Collaboration. New Jersey: JohnWiley & Sons,Ltd; p. 1-51, 2010.
13. HAIE-MEDER, C.; MORICE, P.; CASTIGLIONE, M. Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, Oxford, v. 21, n. 5s, p. 37-40, maio 2010.
14. HERNANDI, Z. et al. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow-up. *BJOG*, Oxford, v. 110, n. 2, p. 205-209, fev. 2003.
15. HO, G. Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl J Med*, Boston, v. 338, n. 7, p. 423-428, fev. 1998.
16. HUANG, H. J. et al. Human papillomavirus genotyping by polymerase chain reaction-based genechip method in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy plus radical surgery. *Int J Gynecol Cancer*, Malden, v. 14, p. 639-649, jul. 2004.
17. HUANG, L. W.; CHAO, S. L.; HWANG, J. L. Human papillomavirus-31-related types predict better survival in cervical carcinoma. *Cancer*, Atlanta, v. 100, n. 2, p. 327-334, jan. 2004.
18. IM, S. S. et al. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res*, Filadélfia, v. 9, n. 11, p. 4145-4150, set. 2003.
19. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: < <http://inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122011.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2012.
20. KEYS, H. M. et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *New Engl J Med*, Boston, v. 340, n.15, p. 1154-61, abr. 1999.
21. KURVINEN, K.; SYRJANEN, K.; SYRJANEN, S. P53 and bcl-2 proteins as prognostic markers in human papillomavirus-associated cervical lesions. *J Clin Oncol*, Alexandria, v. 14,n. 7, p. 2120-2130, jul. 1996.
22. LANCIANO, R. M. et al. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, Fairfax, v. 25, n. 3, p. 391-7, fev. 1993.

23. LINDEL, K. et al. Human papillomavirus status in advanced cervical cancer: predictive and prognostic significance for curative radiation treatment. *Int J Gynecol Cancer*, Malden, v. 15, n.2, p. 278-284, mar. 2005.
24. LOMBARD, I. et al. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol*, Alexandria, v. 16, n. 8, p. 2613-2619, ago. 1998.
25. MANDIC, A.; VUJKOV, T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream of the future? *Ann Oncol*, Oxford, v. 15, n. 2, p. 197-200, fev. 2004.
26. MORRIS, M. et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*, Boston, v. 340, n. 15, p. 1137-43, abr. 1999.
27. MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, Boston, v. 348, n. 6, p. 518-527, fev. 2003.
28. NAGAI, Y. et al. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol*, Filadélfia, v. 191, n. 6, p. 1907-1913, dez. 2004.
29. NOBEYAMA, H. et al. Association of HPV infection with prognosis after neoadjuvant chemotherapy in advanced uterine cervical cancer. *Int J Mol Med*, Atenas, v. 14, n.1, p. 101-105, jul. 2004.
30. OTA, T. et al. Treatment of squamous cell carcinoma of the uterine cervix with radiation therapy alone: long-term survival, late complications, and incidence of second cancers. *Brit J Cancer*, Londres, v. 97, n. 8, p. 1058-1062, set. 2007.
31. PAULO, M. et al. The environmental cofactors in carcinogenesis in high risk HPV/HIV-positive women. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 11, n. 2, p.189-195, abr. 2007.
32. PECORELLI, S. et al. Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecological Cancers. FIGO. http://www.igo.org/files/igo-corp/docs/staging_booklet.pdf. Publicado em 2006. Acesso em set. 2011.
33. PETGNAT, P.; ROY, M. Diagnosis and management of cervical cancer. *BMJ*, Londres, v. 335, n. 7623, p. 765-768, out. 2007.
34. PILCH, H. et al. The presence of HPV DNA in cervical cancer: correlation with clinico-pathologic parameters and prognostic significance: 10 years experience at the Department of obstetrics and gynecology of the Mainz University. *Int J Gynecol Cancer*, Malden, v. 11, n. 1, p. 39-48, jan. 2001.

35. ROSE, P. G. et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *New Engl J Med*, Boston, v. 340, n. 15, p. 1145-53, abr. 1999.
36. ROSE, P. G. Combined-modality therapy of locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol*, Alexandria, v. 21, n.10s, p. 211s-217s, maio 2003.
37. VALE, C. L. et al. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: individual patient data meta-analysis (Review). The Cochrane Collaboration. New Jersey: JohnWiley & Sons,Ltd; p. 1-43, 2010.
38. VILADIU, P. et al. Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomaviruses 16 E2, L2 e E7 peptides as predictors of survival in patients with squamous cell cervical cancer. *J Clin Oncol*, Alexandria, v. 15, n. 2, p. 610-619, fev. 1997.
39. WU, T. C.; KURMAN, R. J. Analysis of cytokine profiles in patients with human papillomavirus-associated neoplasms. *J Natl Cancer I*, Oxford, v. 89, n. 3, p.185-7, fev. 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

SOBREVIDA E FATORES DE PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CÂNCER INVASIVO DO COLO UTERINO

1- Nome _____

2- Registro _____

Endereço _____

Telefone _____ 3- Data de Nascimento _____

4- Idade ao diagnóstico _____ 5- N° Laboratório _____

6- Tabagismo 1 sim 2 não 3 SI

7- Fazia preventivo 1 sim 2 não 3 SI

8- Freq. do preventivo 1 semestral 2 anual 3 outros 4 não se aplica 5 SI

9- Último preventivo _____ 10- Data 1ª consulta ____ / ____ / ____

11 - Data do diagnóstico _____ 12- 1 Citologia 2 Biópsia 3 Ambos

13- Tipo histológico 1 CEC 2 Adenocarcinoma 3 Carcinoma mal diferenciado
4 Outro

14- Grau histológico 1 2 3 SI

15- Estadiamento clínico IA IB IIA IIB IIIA IIIB IVA IVB

16- HPV 1 Positivo 2 Negativo 3 Indeterminado

17- Tratamento 1 sim 2 não

18- Razões para não tratamento: 1 Sem condições clínicas
2 Abandono de tratamento
3 Recusa do tratamento
4 Complicações do tratamento
5 Sem informação
6 Não se aplica
7 óbito

19- Data do 1º Tratamento ____/____/____

20- 1 Cirurgia 2 Radioterapia 3 Quimioterapia 4 Combinado

21- Ordem do tratamento _____

Cirurgia

22- 1 sim 2 não

23- 1 Wertheim 2 HTA total 3 HTA subtotal 4 não se aplica

Radioterapia:

24- 1 sim 2 não

25- 1 Pré-operatória 2 Pós-op. 3 Exclusiva 4 Combinada 5 não se aplica 6 Pré e Pós

26- Pré-operatória 1 sim 2 não **27-** Dose _____

28- Início ____/____/____

29- Término ____/____/____

30- Pós-operatório 1 sim 2 não

31- Dose pélvica _____

32- Dose BQT _____

33- Início ____/____/____

34- Término ____/____/____

35- 1 Exclusiva 2 Combinada 3 Não

36- Dose pélvica _____

37- Dose BQT _____

38- Paramétrio _____

39- Início ____/____/____

40- Término ____/____/____

Quimioterapia

41- 1 sim 2 não

42- 1 Neoadjuvante 2 Paliativa 3 não se aplica

43- Esquema 1 5FU + CDDP 2 CDDP semanal 3 Outro 4 Não se aplica

44- Nº de ciclos (ou semanas): 1 2 3 4 5 6 7 8 Não

45- Início ____/____/____

46- Término ____/____/____

Término do primeiro tratamento

47- 1 Resposta completa 2 Resposta não completa 3 SI 4 Não se aplica 5 Óbito

Seguimento

48- 1 Sim 2 Não

49- Evolução

<u>Estado da doença</u>	<u>Tratamento</u>
1 Sem evidência de doença	1 Nenhum
2 Doença local	2 Quimioterapia
3 Metástase à distância	3 Radioterapia
	4 Sintomático

	Data	Estado da doença	Tratamento
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

Óbito

50- 1 sim 2 não

51- Data ____/____/____

ANEXOS

ANEXO 1 – ESTADIAMENTO CLÍNICO DO CÂNCER DO COLO UTERINO

Definição do TNM

A definição das categorias do T correspondem aos estágios aceitos pela Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO). Ambos os sistemas são incluídos para comparação.

Tumor Primário (T)

TNM Categorias	FIGO Estágios	
TX		Tumor primário não pode ser avaliado
T0		Sem evidência de tumor primário
Tis	0	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	I	Carcinoma cervical confinado ao útero (extensão ao corpo deve ser desconsiderada)
*T1a	IA	Carcinoma invasivo diagnosticado apenas pela microscopia. Invasão estromal com uma profundidade máxima de 5 mm medida da base do epitélio e 7mm ou menos de extensão horizontal. Envolvimento do espaço vascular, venoso ou linfático, não afeta a classificação
T1a1	IA1	Medida da invasão estromal de 3 mm ou menos em profundidade e de 7 mm ou menos na extensão horizontal
T1a2	IA2	Medida da invasão estromal maior que 3 mm e menor que 5 mm com 7 mm ou menos de extensão horizontal
T1b	IB	Lesão clínica visível confinada a cérvix ou lesão microscópica maior que T1a/IA2
T1b1	IB1	Lesão clínica visível de 4 cm ou menos na sua maior dimensão
T1b2	IB2	Lesão clínica visível maior do que 4 cm na sua maior dimensão
T2	II	Carcinoma cervical invade além do útero, mas não a parede pélvica ou o terço inferior da vagina
T2a	IIA	Tumor sem invasão parametrial
T2b	IIB	Tumor com invasão parametrial
T3	III	Tumor se estende a parede pélvica e/ou invade o terço inferior da vagina, e/ou causa hidronefrose ou rim não funcional
T3a	IIIA	Tumor invade o terço inferior da vagina, sem extensão a parede pélvica
T3b	IIIB	Tumor se estende a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcional
T4	IVA	Tumor invade mucosa da bexiga ou do reto, e/ou se estende além da pelve verdadeira (edema bolhoso não é suficiente para classificar um tumor como T4)

* Todas as lesões visíveis – mesmo com invasão superficial – são T1b/IB

Linfonodos regionais (N)

NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases em linfonodos regionais
N1	Metástases em linfonodos regionais

Metástase à distância (M)

MX		Metástase à distância não pode ser avaliada
M0		Sem metástase à distância
M1	IVB	Metástase à distância

Grupos de estadiamento

E0	Tis	N0	M0
E1	T1	N0	M0
E1A	T1a	N0	M0
E1A1	T1a1	N0	M0
E1A2	T1a2	N0	M0
E1B	T1b	N0	M0
E1B1	T1b1	N0	M0
E1B2	T1b2	N0	M0
EII	T2	N0	M0
EIIA	T2a	N0	M0
EIIB	T2b	N0	M0
EIII	T3	N0	M0
EIIIA	T3a	N0	M0
EIIIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N1	M0
	T3b	Qualquer N	M0
IVA	T4	Qualquer N	M0
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Armóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.
Fone: (81) 2101.1530 – Fone/Fax: (81) 2101.1536
E-mail: cephuoc@yahoo.com.br

Reunião: 29/04/2008

Projeto CEP/HUOC: 023/2008

Projeto: Avaliação de fatores de prognósticos nas pacientes portadoras de neoplasma maligna invasiva do colo uterino

Pesquisador Principal: Carla Limeira Barreto

Resultado:

- Projeto de pesquisa – APROVADO.

Ricardo
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Prof. Wilson de Oliveira Jr
Coordenador

Carla 06/06/08
Baudu