



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MÁRCIA POINHO ENCARNAÇÃO DE MORAIS

**PRESENÇA DO DNA PLASMÁTICO DOS *PAPILLOMAVIRUS*
HUMANOS 16 E 18 COMO MARCADOR DE
RECIDIVA/PERSISTÊNCIA DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO**

Manaus – AM

2024



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MÁRCIA POINHO ENCARNAÇÃO DE MORAIS

**PRESENÇA DO DNA PLASMÁTICO DOS *PAPILLOMAVIRUS*
HUMANOS 16 E 18 COMO MARCADOR DE
RECIDIVA/PERSISTÊNCIA DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. KÁTIA LUZ TORRES SILVA

Coorientadora: Profa. Dra. VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS

Manaus – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M827p Morais, Márcia Poinho Encarnação de
Presença do DNA plasmático dos Papillomavirus humanos 16 e 18 como marcador de recidiva/persistência do câncer de colo do útero / Márcia Poinho Encarnação de Moraes . 2024
42 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Kátia Luz Torres Silva
Coorientadora: Valquíria do Carmo Alves Martins
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. HPV- Papillomavirus humano. 2. DNA- ácido desoxirribonucleico- livre . 3. Neoplasias do colo uterino. 4. recidiva. 5. Amazonas. I. Silva, Kátia Luz Torres. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MÁRCIA POINHO ENCARNAÇÃO DE MORAIS

**PRESENÇA DO DNA PLASMÁTICO DOS *PAPILLOMAVIRUS*
HUMANOS 16 E 18 COMO MARCADOR DE
RECIDIVA/PERSISTÊNCIA DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva (Presidente)
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie (Membro Interno)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos (Membro Externo)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Toni Ricardo Martins (Membro Externo)
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Caroline Souza dos Anjos (Membro Externo)
Serviço de Oncologia da Rede D'Or Maceió

Manaus, abril de 2024

Às pacientes da FCECON, que contribuíram para que este estudo fosse possível; e
à minha família, que sempre me acompanha em todos os meus desafios.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora**, por terem me conduzido até aqui, pela força e pela intercessão nos momentos mais difíceis.

À minha família, que esteve sempre presente comigo nesta caminhada. Ao meu marido, **Alexandre**, pela compreensão, apoio e estímulo em todos os momentos. Aos meus amados filhos **Alessandra** e **Matheus**, que dão sentido à minha existência.

Aos meus pais, **Graça** e **Encarnação**, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e que continuam proporcionando-me muito amor, tranquilidade, incentivo e muitas orações.

À querida orientadora, Profa. Dra. **Kátia Luz Torres Silva**, minha amiga de longas datas. Quantos momentos profissionais e pessoais partilhados juntos, principalmente os que fortaleceram nossa fé! É a pessoa que sempre foi uma entusiasta no meio científico; sou grata por estarmos juntas em mais um momento importante de minha vida.

À querida coorientadora, Dra. **Valquíria do Carmo Alves Martins**, amiga que reencontrei nesta fase de minha vida, que me conduziu ao laboratório de biologia molecular compartilhando seus ensinamentos; agradeço a paciência com a qual me ensinou as etapas das análises. Obrigada pelas nossas conversas engrandecedoras e incentivadoras, principalmente na etapa final quando o desânimo e o cansaço pareciam me derrubar.

A todos os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Imunologia Básica e Aplicada pelos ensinamentos, auxílio, amizade e sobretudo pela nossa superação em adequar-nos à nova realidade durante a pandemia de covid-19.

A todos os colegas da Diretoria de Ensino e Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas pelo apoio, acolhimento e palavras incentivadoras.

Às minhas alunas de iniciação científica **Júlia Neves Becil**, **Laura Luiza Moreira da Silva Dias** e **Layane da Silva Pinheiro** pelo apoio na abordagem das pacientes.

Aos cirurgiões oncológicos **Dr. Higino Figueiredo** e **Dr. Daniel Lira** e à enfermeira **Tânia de Souza** pelas coletas de tecidos das pacientes.

À assistente social **Keity Bentes** por ter-me proporcionado a oportunidade de acompanhar algumas visitas domiciliares às pacientes.

Aos queridos colaboradores **Mikele Praia de Oliveira**, **Ellen Juliany Duarte Prestes** e **Jhonnatan Silva de Souza** pelo imenso apoio nas coletas das amostras biológicas das pacientes.

À querida **Flávia Níniver Lima de Oliveira** por todo o suporte e pela parceria durante a execução das análises laboratoriais.

Ao Prof. **Dr. José Eduardo Levi** (Instituto de Medicina Tropical – Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo) pelos ensinamentos oportunizados para este estudo.

À querida **Lorena Lopes** pelo apoio na construção (desenho) do *swimmer plot*, pois era um grande desejo nosso, o qual, devido a algumas limitações, não estávamos conseguindo concluir; e ela muito tranquilamente acalmou minha angústia.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta em nome do **Dr. André Luiz Leturiondo** pela amizade, pelo apoio e pelo suporte técnico dispensados.

Às minhas amigas de Doutorado **Heidy Halanna, Suzana Nunes, Lígia Abdalla, Rosmery Duran e Juliana de Andrade** agradeço o carinho, as experiências, os conhecimentos partilhados e sobretudo os momentos de desabafo durante a jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por meio do Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS), Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC) e Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO) pelo suporte financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram na construção coletiva deste Doutorado – o meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Nunca se preocupe com números. Ajude uma pessoa de cada vez; e sempre comece pela mais próxima de você”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O câncer de colo do útero (CCU) é considerado um problema de saúde pública mundial e origina-se a partir da infecção persistente do Papillomavirus humano (HPV) oncogênico, principalmente os genótipos 16 e 18. O follow up das pacientes, após tratamento do CCU, pode levar a um melhor prognóstico e aumentar a sobrevivência dessas mulheres por meio do monitoramento de detecção precoce de recidiva/persistência, o qual pode ser feito pela detecção do DNA circulante do HPV no plasma das pacientes, e a presença do material genético do vírus está associado à tendência de desenvolver recidiva/persistência. **Objetivo:** Analisar a presença do DNA circulante livre do HPV (cf- DNA HPV) no plasma como marcador preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do câncer de colo do útero. **Metodologia:** Tratou-se de um estudo de coorte prospectivo envolvendo mulheres amazônidas em tratamento na Fundação Centro de Controle de Oncologia, no qual as coletas das amostras ocorreram em quatro momentos: fase zero (antes do início do tratamento), fase 1 (cerca de seis meses após o início do tratamento), fase 2 (cerca de nove meses após o início do tratamento) e fase 3 (cerca de 18 meses após o início do tratamento). As mulheres foram divididas em Grupo A (FIGO IA a IIB) e Grupo B (FIGO IIIA a IVA). Para detecção de HPV, as amostras foram submetidas a ensaio de real-time PCR (qPCR) tendo como alvo o gene E7 dos HPV 16 e 18. **Resultados:** 39 pacientes diagnosticadas com câncer de colo do útero no período de 31 de agosto de 2020 a 30 de setembro de 2022 foram incluídas no estudo, 13 do Grupo A e 26 do Grupo B. A idade variou entre 25 e 80 anos, com idade média $48,4 \pm SD 13,4$; Dezoito mulheres (46,1%) relataram serem analfabetas ou terem ensino fundamental incompleto; 30 (77,0%) não possuíam renda ou possuíam renda de até um salário-mínimo; 31 (79,5%) tiveram a primeira relação sexual entre 12 e 17 anos; 17 (43,6%) foram hiper-rastreadas conforme as diretrizes brasileiras (mais de uma citologia a cada três anos); uma (16,7%) tinha infecção por HIV; 59,1% informaram não fazer o exame de rastreio para o CCU por inibição, vergonha, medo ou falta de tempo; 35 (89,7%) tiveram diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas, quatro (10,3%) de adenocarcinoma; 26 (66,5%) apresentaram estágio III-IV. A escolha terapêutica mais frequente foi quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) (74,4%); 12 (30,8%) mulheres apresentaram recidiva/persistência da doença após tratamento; quatro (10,3%) foram a óbito; 21 (53,8%) foram positivas antes do tratamento para cf- DNA HPV 16 no plasma e nenhuma para HPV 18; o grupo B apresentou maior frequência de cf- DNA HPV detectável (81,0%) ($p = 0,041$); uma paciente foi positiva para HPV16 nas fases zero, 1 e 2 de modo que na fase 1 houve diminuição do número de cópias de cf- DNA HPV 16, fato que coincidiu com o término da radioterapia; em paciente que apresentou recidiva/persistência da doença, foi possível detectar o cf- DNA HPV no plasma seis meses antes do diagnóstico de recidiva/persistência da doença. A data da primeira consulta e o início do tratamento variaram entre um e 29 meses, com valor médio igual a 6 ± 5 meses. **Conclusão:** A detecção do cf- DNA HPV é um marcador clinicamente útil na vigilância pós-tratamento do câncer de colo do útero. O cf- DNA HPV pôde ser detectado 6 meses antes da recidiva/persistência da doença.

Palavras-chave: HPV, DNA livre, neoplasia do colo uterino, recidiva, Amazonas.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is considered a global public health problem and originates from persistent infection with oncogenic Human Papillomavirus (HPV), mainly genotypes 16 and 18. Follow-up of patients after treatment of CC, can lead to a better prognosis and increase the survival of these women through monitoring early detection of relapse/persistence, which can be done by detecting circulating HPV DNA in patients' plasma, and the presence of HPV genetic material. virus is associated with the tendency to develop relapse/persistence. Objective: To analyze the presence of circulating HPV DNA in plasma as a predictive marker of disease relapse/persistence in monitoring cervical cancer treatment. **Objective:** This study aimed to analyze the presence of circulating HPV DNA in plasma as a predictive marker for disease recurrence/persistence in the monitoring of cervical cancer treatment. **Methods:** This was a prospective cohort study involving Amazonian women undergoing treatment at the Fundação Centro de Controle de Oncologia, in which samples were collected at four stages: phase zero (before the start of treatment), phase 1 (around six months after starting treatment), phase 2 (about nine months after starting treatment) and phase 3 (about 18 months after starting treatment). The women were divided into Group A (FIGO IA to IIB) and Group B (FIGO IIIA to IVA). To detect HPV, the samples were subjected to a real-time PCR (qPCR) assay targeting the E7 gene of HPV 16 and 18. **Results:** 39 patients diagnosed with cervical cancer between August 31, 2020 and September 30, 2022 were included in the study, 13 from Group A and 26 from Group B. Age ranged between 25 and 80 years, with mean age 48.4 \pm SD 13.4; Eighteen women (46.1%) reported being illiterate or having incomplete primary education; 30 (77.0%) had no income or had an income of up to one minimum wage; 31 (79.5%) had their first sexual intercourse between 12 and 17 years old; 17 (43.6%) were hyper-screened according to Brazilian guidelines (more than one cytology every three years); one (16.7%) had HIV infection; 59,1% reported not taking the CC screening exam due to inhibition, shame, fear or lack of time; 35 (89.7%) had a histopathological diagnosis of squamous cell carcinoma, four (10.3%) of adenocarcinoma; 26 (66.7%) presented stage III-IV. The most frequent therapeutic choice was chemotherapy (CT) and radiotherapy (RT) (74.4%); 12 (30.8%) women presented relapse/persistence after treatment; four (10.3%) died; 21 (53.8%) were positive before treatment for HPV 16 in plasma and none for HPV 18; group B had a higher frequency of detectable circulating HPV DNA (81.0%) ($p = 0.041$); one patient was positive for HPV16 in phases zero, 1 and 2 so that in phase 1 there was a decrease in the number of circulating HPV16 DNA copies, a fact that coincided with the end of radiotherapy; in a patient who had relapse/persistence of the disease, it was possible to detect circulating HPV DNA in plasma six months before the clinical diagnosis of relapse/persistence. The date of the first consultation and the start of treatment varied between one and 29 months, with an average value of 6 \pm 5 months. **Conclusions:** Detection of cf-DNA HPV is a clinically useful marker in post-treatment surveillance of cervical cancer. Cf- HPV DNA could be detected 6 months before disease relapse/persistence.

Keywords: HPV, free DNA, cervical neoplasia, recurrence, Amazonas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das principais proteínas do genoma do HPV	20
Figura 2 – Representação da replicação do HPV no epitélio basal. (A) início da infecção pelo HPV. (B) Ciclo e replicação viral.	21
Figura 3 – Representação espacial das taxas estimadas de incidência por CCU no Brasil ajustadas por idade pela população mundial, por 100 mil mulheres, segundo Unidade da Federação	24
Figura 4 – Taxas de mortalidade por câncer do colo do útero ajustada por idade pela população mundial. Brasil e regiões, 2000 a 2021	25
Figura 5 – Patogênese do câncer de colo do útero	29
Figura 6 – Representação esquemática da resposta imune contra o HPV. A - Representação esquemática da resposta imune mostrando o clearance viral. B - Representação esquemática mostrando a evasão do sistema imune	30
Figura 7 – Representação esquemática do exame de colposcopia	33
Figura 8 – Esquema sobre o princípio da biópsia líquida	45
Figura 9 – Estratégia diagnóstica para detecção do DNA do HPV 16 e HPV 18 nas amostras das pacientes com câncer de colo do útero	54
Figura 10 – Curva-padrão de amplificação para cálculo do número absoluto de moléculas de HPV presentes na amostra testada	59
Figura 11 – Seleção das pacientes e coleta das amostras	60
Figura 12 – Mulheres elegíveis para o estudo	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estadiamento do câncer de colo do útero, Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia – FIGO, 2018	39
Quadro 2 – Caracterização dos grupos de pacientes	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Adenocarcinoma
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASC	Adenoescamoso
°C	Graus Celsius
CEC	Carcinoma de células escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CCU	Câncer de colo do útero
cf-DNA	DNA livre de células
CID	Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde
CT	<i>Threshold cycle</i>
CTL	Linfócito T citotóxico
ddPCR	<i>Droplet digital PCR</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus <i>Epstein-Barr</i>
FDA	Federal Drug Administration
E1	<i>Protein Early 1</i>
E2	<i>Protein Early 2</i>
E4	<i>Protein Early 4</i>
E5	<i>Protein Early 5</i>
E6	<i>Protein Early 6</i>
E7	<i>Protein Early 7</i>
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HSIL	Lesões intraepiteliais de alto grau
HPV	<i>Papillomavirus</i> humano
HR-HPV	High Risk Human <i>Papillomavirus</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IMT-SP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IFNs	Interferons
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
L1	Proteína Late 1
L2	Proteína Late 2
LBC	Citologia em base líquida
LCR	<i>Long control region</i>
LR-HPV	<i>Low Risk Human Papillomavirus</i>
LSIL	Lesões intraepiteliais de baixo grau
M	Molar
mL	Mililitro
NICs	Neoplasias intraepiteliais cervicais

NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1
NIC 2	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2
NIC 3	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2
NK	<i>Natural killer</i>
ng/ml	Nanograma por mililitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAIC	Programa de Apoio à Iniciação Científica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunização
PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
pRB	Proteína do retinoblastoma
PRRs	Receptores de reconhecimento de patógenos
p53	Proteína p53
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMN	Tumor, nódulo e metástase
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Papillomavirus</i> humano (HPV).....	19
2.2 Câncer de colo do útero.....	23
2.2.1 Epidemiologia	23
2.2.2 Fatores de risco	26
2.2.3 História natural do câncer de colo do útero e resposta imune.....	27
2.2.4 Métodos de diagnósticos do câncer de colo do útero e do HPV	31
2.2.5 Vacinas.....	36
2.2.6 Estadiamento e tratamento do câncer de colo do útero	38
2.3 Recidiva e persistência do câncer de colo do útero	40
2.4 Biópsia líquida	42
2.5 DNA livre-circulante (<i>cell-free</i> DNA ou cfDNA).....	43
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo geral:	49
4.2 Objetivos específicos:.....	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Modelo de estudo	50
5.2 Local de estudo	50
5.3 População de estudo	50
5.4 Amostragem	50
5.5 Critérios de elegibilidade.....	51
5.6 Métodos a serem aplicados e materiais a serem utilizados	52
5.6.1 Procedimentos de abordagem a paciente com câncer de colo do útero, coleta de dados clínicos e epidemiológicos.....	52
5.6.2 Procedimentos de coleta e conservação das amostras biológicas.....	53
5.6.3 Procedimento de triagem laboratorial	54
5.6.4 Extração do ácido nucleico	55
5.6.5 Quantificação do DNA extraído.....	56
5.6.6 Detecção do gene da β - actina humana	56
5.6.7 Detecção e genotipagem do HPV 16 e HPV 18.....	57
5.6.8 Quantificação da carga viral HPV 16 em amostra de plasma	58

5.6.9 Coleta das amostras de plasma das pacientes em <i>follow up</i>	59
5.7 Análise estatística.....	60
5.8 Aspectos éticos do estudo.....	61
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	63
8 DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	64
9 PERSPECTIVAS	65
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
11 ANEXOS	84
12 APÊNDICES.....	86

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero (CCU) é o quarto tipo de neoplasia maligna prevalente nas mulheres, caracterizando um sério problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento (1). No mundo a incidência e a mortalidade desse câncer são de 604.127 casos/ano e de 341.831 óbitos/ano (2)

No Brasil, foram estimados 17.010 casos novos de câncer de colo do útero para cada ano do triênio 2023-2025, com incidência estimada de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres. Em termos de mortalidade em 2020, ocorreram 6.627 óbitos, e a taxa de mortalidade bruta por câncer de colo do útero foi de 6,12 mortes a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCU é o segundo mais incidente na Região Norte (20,48 casos/100 mil mulheres). No Estado do Amazonas a taxa de incidência ajustada é de 31,7 novos casos por 100 mil mulheres para o ano de 2023 e uma taxa de mortalidade ajustada de 14,49 óbitos por 100 mil mulheres em 2020 (3)

Potencialmente, todos os casos de câncer de colo do útero estão relacionados à infecção persistente pelo *Papillomavirus* humano oncogênico (HPV). Vários fatores podem influenciar essa persistência viral: o genótipo, o tropismo celular e a capacidade imunológica da mulher para promover ou não o *clearance viral* (4–6). A maioria das infecções por HPV é assintomática e autorresolutiva e pode ter regressão espontânea em torno de 90% dos casos em dois anos. Contudo, em cerca de 10% das mulheres, a infecção é perdurável e pode evoluir para o câncer de colo do útero (7). Ao conhecer a história natural da infecção por esse vírus e os processos necessários para que uma lesão precursora progrida para um câncer, uma etapa importante é o diagnóstico precoce dessas lesões, o que viabiliza a prevenção e a cura da doença (8–10).

O contínuo avanço para melhoria na investigação do câncer levou à descoberta de DNA livre de células circulantes (cf-DNA) no soro e no plasma de pacientes com essa patologia, o que possibilitou a abertura de um novo campo de pesquisa no diagnóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento. O DNA tumoral circulante (ctDNA) é um tipo de cfDNA sérico encontrado em pacientes com câncer e contém

informações abundantes sobre as características do tumor de modo que se destaca seu potencial valor diagnóstico no cenário clínico. Nesse sentido, o DNA livre do HPV (cf-DNA HPV) tornou-se um foco importante para o diagnóstico precoce e para o prognóstico no câncer de colo do útero (11).

Normalmente, o CCU é causado por HPVs de alto risco (hrHPVs), principalmente os genótipos 16 e 18. Os hrHPVs linearizam o DNA para integração no genoma do hospedeiro e induzem a expressão dos genes E6 e E7, que estão envolvidos na oncogênese do CCU (12,13). As células tumorais e o cf-DNA HPV abrigam rearranjos genômicos que podem ser liberados no sangue periférico da paciente. Desse modo, do ponto de vista do monitoramento diagnóstico, a presença de cf-DNA HPV no sangue periférico de pacientes com câncer de colo do útero pode ser usada como biomarcador tumoral e como mecanismo de detecção precoce de recidiva/persistência em mulheres após tratamento (11,14).

Atualmente, as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero estão em processo de atualização para abordar as recomendações de utilização do teste DNA-HPV, com a definição de faixa etária e periodicidade do rastreamento. No dia 8 de março de 2024, foi publicada a Portaria SECTICS/MS nº 3, de 07 de março de 2024, que incorpora os testes moleculares para detecção de HPV oncogênico (DNA-HPV), no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

Os tratamentos disponíveis para o câncer de colo do útero apresentam taxas de cura em torno de 80% a 90% em pacientes diagnosticados em estágio inicial da doença e aproximadamente de 60% em pacientes com doença mais avançada; algumas dessas mulheres podem apresentar recidiva/persistência da doença após tratamento primário(15–17) A quimiorradioterapia concomitante é o tratamento padrão para o CCU localmente avançado e é eficaz para muitas pacientes; no entanto a mortalidade relacionada ao câncer de colo do útero permanece elevada (18)

A alta morbimortalidade pelo câncer de colo do útero no Amazonas, que é o maior estado do Brasil, com uma área geográfica de 1.559.159.148 km², é atribuída ao retardo no diagnóstico. A dificuldade de acesso aos serviços de saúde é uma realidade, pois existem grandes desafios geoespaciais e ambientais, que incluem enchentes e secas sazonais da Região Amazônica. Ademais, a infraestrutura hospitalar é insuficiente, pois existem somente cinco unidades de saúde pelo SUS que

oferecem o exame de colposcopia – todos localizados na capital, Manaus. Logo, as mulheres residentes no interior do Estado lidam, diariamente, com a falta de infraestrutura e com o difícil acesso à saúde, o que as leva ao direcionamento tardio para o hospital de referência no tratamento do câncer (19–21).

Destarte, quanto mais o diagnóstico é retardado, maiores as chances de o câncer de colo do útero tornar-se invasivo, o que compromete outros órgãos e resulta em tratamentos mais agressivos e com menores chances de cura da paciente. Vários estudos foram realizados demonstrando a utilização do teste de DNA circulante do HPV (cDNA HPV) na detecção precoce de recidiva em mulheres em tratamento para o CCU (22). Nesse sentido, este estudo buscou descrever a presença do DNA circulante do HPV no plasma como marcador preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do câncer de colo do útero.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Papillomavirus* humano (HPV)

Na Antiguidade as verrugas genitais, também conhecidas como *condilomas*, eram bastante comuns, e os médicos gregos e romanos foram os primeiros a observar a transmissão sexual dessas lesões (23). Contudo a primeira evidência da etiologia viral foi reportada na Itália, no início do século XX (24)

A utilização da microscopia eletrônica – a partir da década de 1930 – e do cultivo de células – na década de 1940 – possibilitou um grande avanço na virologia. Em 1949, foi demonstrada a presença de partícula viral por meio da microscopia eletrônica; e um ano mais tarde, foi possível caracterizar o *Papillomavirus* humano (HPV) como o agente etiológico das verrugas (25).

Na década de 1970, após inúmeras pesquisas, Harald Zur Hausen identificou diversos tipos de HPV em várias lesões de pele e de mucosas (verrugas, displasias epiteliais e carcinomas de cérvix uterina e de pênis), o que reforçou a importância médica do HPV. Por meio de métodos de biologia molecular, foi demonstrada a correlação do HPV com o câncer cervical (26).

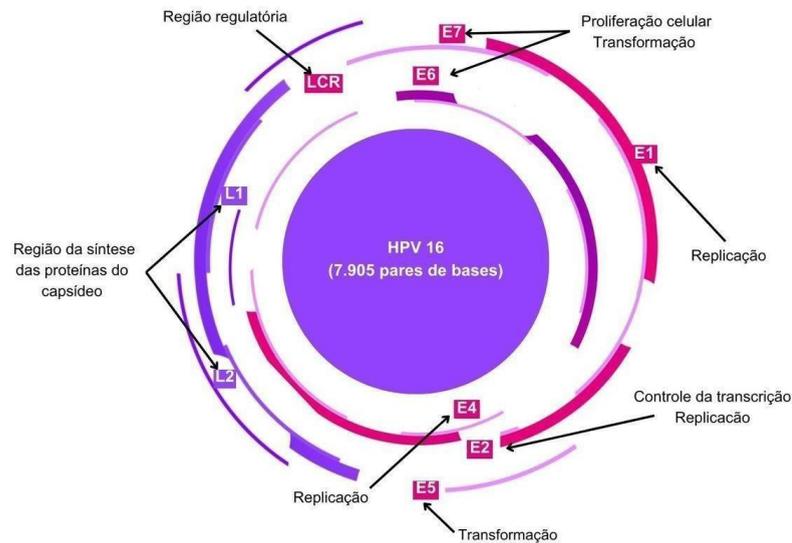
O *Papillomavirus* humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, que compõe um grupo diverso de vírus epiteliotrópicos que podem causar alterações verrucosas e neoplásicas nos epitélios em diferentes locais anatômicos. São vírus não envelopados de simetria icosaédrica, que apresentam uma única molécula de DNA de dupla hélice circular com cerca de 8.000 pares de bases (27).

O DNA circular é composto por três segmentos (**Figura 1**):

1. Região precoce: com seis genes precoces “E” (do inglês *early*) que codificam as proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) na replicação viral e na transformação.
2. Região tardia: que contém dois genes tardios “L” (do inglês *late*) (L1 e L2), responsáveis pela síntese das proteínas do capsídeo.

3. Região regulatória: “LCR” (do inglês *long control region*), região não codificante responsável pelo controle da transcrição e que contém a origem da replicação viral (28).

Figura 1 – Representação esquemática das principais proteínas do genoma do HPV



Fonte: Adaptado de Villa e Denny (2006) (29)

Filogeneticamente, os HPVs são classificados com base na semelhança de suas sequências de DNA no gene L1, em cinco gêneros: *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu* (30). Os vírus dos gêneros *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu* infectam especificamente o epitélio cutâneo, enquanto os vírus do gênero *Alpha* infectam os epitélios cutâneo e mucoso. Além desse tropismo tecidual distinto, os vírus pertencentes a esses gêneros diferem em sua associação com a clínica das doenças (31).

Nos humanos os gêneros de HPVs de importância são: *Alpha*, *Beta* e *Gamma*; os dois últimos estão associados a verrugas cutâneas, e a maioria dessas infecções são assintomáticas. Os genótipos pertencentes ao gênero *Alpha* são ainda classificados como HPV de baixo risco (LR-HPV) ou HPV de alto risco (HR-HPV) oncogênico, com base em sua capacidade de desenvolver câncer (31).

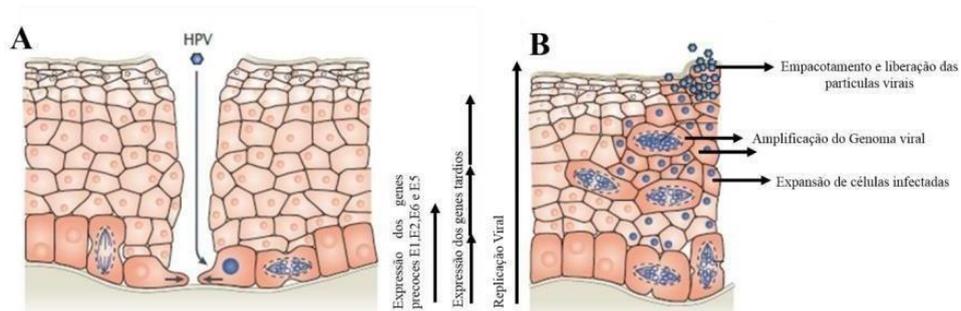
A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou os genótipos dos HPVs 16, 18, 45, 33, 31, 52, 58, 35, 39, 51, 59 e 56 (listados na ordem de risco, do maior para o menor) por estarem associados com lesões intraepiteliais

escamosas de alto grau (HSIL) ou câncer cervical, sendo os HPVs 16 e 18 responsáveis por cerca de 70% do total desse tipo de câncer (32,33). Os genótipos 53 e 68, entre outros, são provavelmente carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 e 81 estão associados ao baixo risco de lesões e comumente são relacionados aos condilomas acuminados, aos condilomas planos ou às lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), conhecidas como neoplasias intraepiteliais cervicais grau 1 (NIC 1) (34,35).

Até o momento, mais de 200 genótipos de HPV foram identificados e caracterizados (36). Destes, cerca de 40 podem infectar o colo do útero. A variação do potencial oncogênico desses tipos de HPVs está relacionada em parte com a expressão de dois genes precoces – E6 e E7 (31).

O HPV é capaz de alterar o ciclo celular pela expressão das proteínas virais desde a entrada na célula hospedeira. Acredita-se que o ciclo de vida viral seja iniciado pela infecção nas células epiteliais basais, infectando os queratinócitos. Inicialmente, o genoma permanece nas células da camada basal, como epissomo estável, com baixo número de cópias, sem integração ao genoma da célula hospedeira. As células basais sofrem divisão celular; as proteínas precoces E1, E2, E6 e E5, permitem a amplificação do genoma viral, há expressão de genes do capsídeo (L1, L2) e a montagem do vírus. Por fim, nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento e a liberação das partículas virais (9,37,38) (**Figura 2**).

Figura 2 – Representação da replicação do HPV no epitélio basal. (A) início da infecção pelo HPV. (B) Ciclo e replicação viral.



Fonte: Adaptado de Banks *et al.* (2012) (38).

Os genes precoces E2, E6 e E7 estão envolvidos principalmente no potencial oncogênico do HPV. As proteínas E6 e E7 interagem diretamente no mecanismo de controle do ciclo celular, degradando e inativando as proteínas p53(53KDa) e pRB (105KDa) respectivamente, o que resulta em acúmulo de mutações oncogênicas, sendo responsáveis pela supressão tumoral, além de apresentarem eficientes mecanismos de evasão do sistema imune. Quando ocorre a integração no genoma humano, o gene E2 torna-se inativo, e ocorre o aumento da transcrição dos genes E6 e E7, que por sua vez inativam as proteínas pRB e P53. Essa ação conjugada de E2, E6 e E7 resulta na interrupção de diversos pontos de checagem do ciclo celular e leva ao acúmulo de mutações em diversos genes celulares, contribuindo para a progressão do câncer cervical (39–41).

A infecção pelo HPV é uma etapa crucial na tumorigênese, sendo responsável por 99,7% dos casos de câncer de colo do útero. Os HPVs 16 e 18 são os dois genótipos mais importantes, identificados em mais de 70% dos carcinomas cervicais em todo o mundo (11).

Vários estudos foram realizados no Estado do Amazonas para identificar a prevalência e os genótipos do HPV na população feminina. Castro *et al.* (2011) realizaram um estudo em Manaus, com mulheres sexualmente ativas sem alterações citológicas e mulheres com alterações citológicas pré-malignas e malignas e utilizaram a técnica de PCR e de sequenciamento. Os genótipos de HPV encontrados foram: 16, 33, 58, 66, 68. O HPV 16 foi o prevalente e apresentou duas variantes semelhantes ao asiático-americano (AA) e às variantes do tipo Leste Asiático (As). Também foi detectado um raro HPV tipo 13 relacionado à doença de Heck (42).

No município de Coari (Amazonas) foi realizado um estudo de prevalência utilizando o exame de Papanicolau e diagnóstico molecular para o DNA do HPV por meio da PCR em 361 mulheres sexualmente ativas, usuárias do serviço de saúde do município, com mais de 18 anos. Verificou-se a presença do DNA do HPV em 105 (29,1%) delas. Os genótipos mais encontrados foram HPV 16 (58,1%) e HPV 58 (20,0%) (43).

Torres *et al* (2018) realizaram um estudo em regiões remotas do Amazonas com mulheres ribeirinhas utilizando a técnica da autocoleta. Foi realizada a detecção da proteína E6; o DNA foi extraído das escovas e avaliado para os genótipos de HPV

por PCR (PGMY09/11), seguido de tipagem pelo Papillocheck™. A prevalência de HPV encontrada foi de 19,1%, sendo prevalente o HPV 51, seguido do HPV 16 (44). Fantin *et al* (2023) (45) realizaram estudo em duas policlínicas de Manaus em mulheres que apresentaram alterações nos exames citológicos e que foram encaminhadas para a colposcopia. As amostras de DNA obtidas do epitélio cervical foram analisadas por PCR com *primers* tipo-específicos para detecção de oito genótipos oncogênicos. Os genótipos encontrados foram: 18 (47,1%), 16 (45,1%), 31 (19,6%), 58 (19,6%), 33 (18,6%) e 45 (15,7%); em mais de 50% dessas mulheres foram detectadas infecções múltiplas com até cinco tipos oncogênicos, o que indicava alto risco de surgimento de novos casos de CCU nessa população. Esses estudos demonstram a diversidade dos genótipos de HPV de alto risco no Amazonas.

2.2 Câncer de colo do útero

2.2.1 Epidemiologia

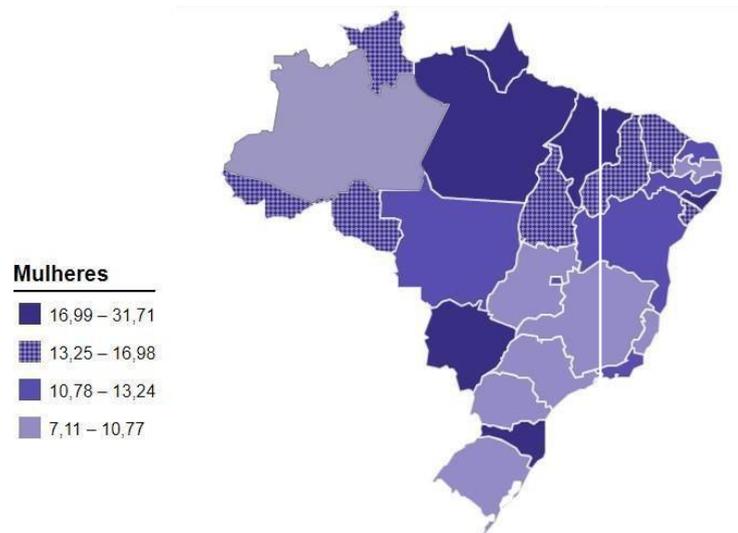
O câncer de colo do útero é um importante problema de saúde pública com alta morbimortalidade. Mundialmente, a incidência e a mortalidade desse câncer são de 604.127 casos/ano e de 341.831 óbitos/ano, sendo a incidência maior nos países em desenvolvimento. Representa a quarta causa de câncer mais comum entre as mulheres; e, quando estratificado por faixa etária, é o segundo mais frequente entre mulheres com idade entre 15 e 44 anos (46).

A ocorrência do CCU varia nas diferentes regiões geográficas, sendo mais comumente diagnosticado em 28 países, sendo a principal causa de morte em 42 países. As maiores taxas de incidência e de mortalidade são observadas na África, tendo a Suazilândia uma taxa de incidência de 43,1/100 mil mulheres; e Malawi e Zimbabwe com taxa de mortalidade de 30/100 mil mulheres (1).

A estimativa de novos casos de CCU no Brasil para o triênio 2023-2025 é de 17.010 casos, com um risco estimado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo do útero é o segundo mais incidente na Região Norte (20,48/100 mil) e no Nordeste (17,59/100 mil), seguido do Centro-Oeste (16,66/100 mil); a Região Sul (14,55/100 mil) ocupa a quarta posição;

e a Região Sudeste (12,93/100 mil), a quinta posição(3). As taxas ajustadas de incidência por Unidade Federativa estão demonstradas na **Figura 3**. No Amazonas, o CCU é o tumor mais frequente entre as mulheres (excluindo câncer de pele não melanoma), com uma incidência de 31,7/100.000; e na capital, Manaus, alcança uma incidência de 36,4/100.000 mulheres (3)

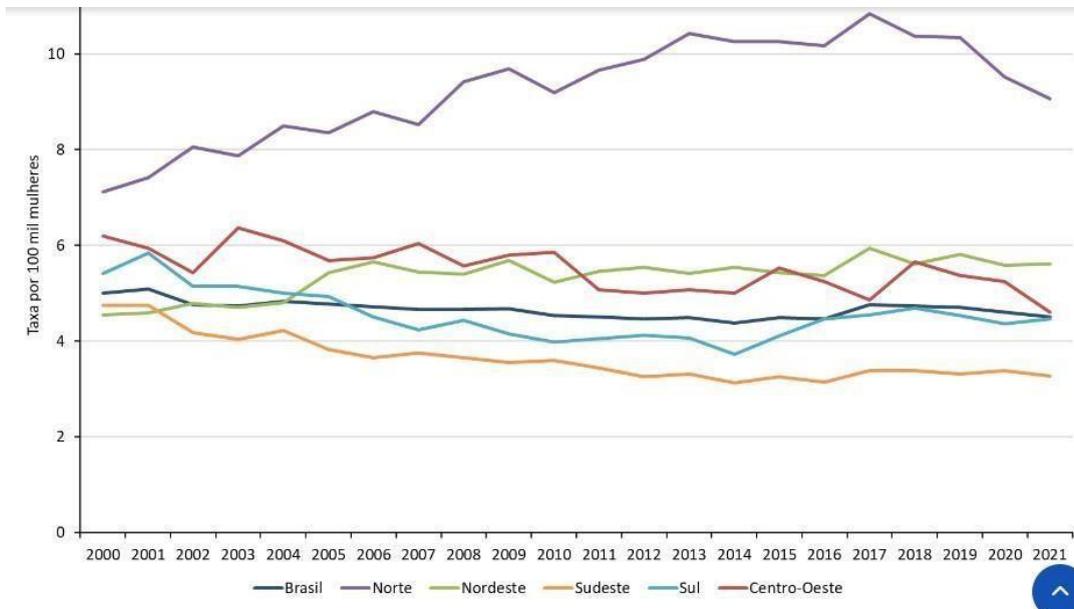
Figura 3 – Representação espacial das taxas estimadas de incidência por CCU no Brasil ajustadas por idade pela população mundial, por 100 mil mulheres, segundo Unidade da Federação



Fonte: INCA, 2022

No Brasil, a taxa de mortalidade por câncer do colo do útero, ajustada pela população mundial, foi de 4,51 óbitos/100 mil mulheres em 2021. Na série histórica das taxas de mortalidade do Brasil e regiões, observa-se que a Região Norte apresenta as maiores taxas do País, com nítida tendência temporal de crescimento entre 2000 e 2017, contudo se nota uma queda a partir de 2018 (3)

Figura 4 – Taxas de mortalidade por câncer do colo do útero ajustada por idade pela população mundial. Brasil e regiões, 2000 a 2021



Fonte: INCA. Atlas de Mortalidade.

As estimativas do INCA dos anos de 2023 a 2025 basearam-se nas taxas de incidência e de mortalidade de períodos anteriores. Entretanto, a pandemia de covid-19 causou interrupções nos sistemas de saúde em todo o mundo; e, em se tratando de casos de câncer, os impactos causados por ela ainda não são totalmente conhecidos. Atrasos relevantes em diagnósticos de câncer foram relatados em diversos países, o que, por conseguinte, retardou o processo de informação nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), sobretudo em países emergentes e subdesenvolvidos (47,48).

Segundo o IARC (2020) as estimativas de novos casos de CCU no mundo para os anos de 2020 e 2040 são de 604 mil casos e de 798 mil casos, respectivamente. Contudo o câncer de colo do útero é considerado passível de erradicação por meio da vacinação e do rastreamento e tratamento das lesões precursoras. A estratégia proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para eliminar a doença como problema de saúde pública inclui as seguintes metas, que devem ser alcançadas até 2030 (49):

1. 90% das meninas totalmente vacinadas contra HPV aos 15 anos.
2. 70% das mulheres submetidas a um teste de rastreamento de alta performance aos 35 e aos 45 anos.

3. 90% das mulheres identificadas com lesões precursoras e câncer recebendo tratamento.

2.2.2 Fatores de risco

O principal fator de risco para o CCU é a infecção persistente pelo HPV, que ocorre quando há presença do mesmo tipo específico de DNA de HPV na amostra repetida após 6-12 meses (50,51). A idade também é um fator de risco a ser considerado, pois mulheres com mais de 40 anos e infectadas com HPV apresentam um risco 30 vezes maior de desenvolver câncer do que mulheres mais jovens (52).

O tabagismo suprime a resposta imune local, e a atividade mutagênica dos componentes do tabaco pode contribuir para a persistência do HPV ou para alterações malignas no colo do útero (53,54).

A multiparidade também é um fator de risco para infecção persistente por HPV e câncer cervical. Os possíveis mecanismos são o aumento dos níveis hormonais e a resposta imunológica durante a gravidez (55). Nas mulheres múltiparas, a zona de transformação permanece mais tempo na ectocérvice, e isso facilita a exposição direta ao vírus e outros potenciais cofatores. No entanto o mecanismo mais plausível é o dano tecidual local que ocorre durante o parto vaginal ou o estresse oxidativo celular com maior probabilidade de dano ao DNA e de integração do HPV (56,57).

O uso prolongado de anticoncepcional também é um fator de risco significativo. Isso ocorre porque a região reguladora do HPV de alto risco contém sequências que são semelhantes aos elementos responsivos do glicocorticoide, que podem ser induzidos por hormônios esteroides como a progesterona, que é o componente ativo dos contraceptivos orais (58,59).

A homeostase do microbioma cervicovaginal é mantida por meio da interação com o microambiente local, no entanto a diversidade da microbiota vaginal no estado saudável é baixa, sendo algumas espécies de *Lactobacillus* dominantes (60,61). A microbiota vaginal foi classificada em cinco diferentes tipos de estado comunitário (CST): *L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III), CST-IV (caracterizado por uma escassez de *Lactobacillus spp.* e por uma ampla gama de anaeróbicos facultativos e estritos) e *L. jensenii* (CST V). O CST IV contém um grupo heterogêneo que se divide em dois subgrupos (CST IV-A e CST IV-B). CST IV-A

possui uma quantidade moderada de *Lactobacillus spp.* e baixas proporções de bactérias anaeróbicas, enquanto CST IV-B tem maior proporção de *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Ruminococcaceae*, *Mobiluncus*, *Sneathia*. Estudos realizados mostraram que, durante a infecção por HPV, o CST II prevalece, e aumenta a eliminação da infecção por HPV, enquanto o subgrupo CST IV se correlacionou com a persistência do HPV (62–65).

Desse modo, a disbiose (perturbação da homeostase da microbiota) do microbioma cervicovaginal pode ameaçar o estado de saúde da mulher devido ao aumento da suscetibilidade a infecções sexualmente transmissíveis, conduzindo ao desenvolvimento de câncer por meio da ruptura da barreira epitelial, da desregulação metabólica, da proliferação celular anormal, da instabilidade do genoma, da inflamação crônica e da carcinogênese (66).

Todavia nem todas as infecções por HPV culminam em CCU. Em torno de 90% delas são transitórias e eliminadas espontaneamente. Contudo, em alguns casos, a infecção persistente resultará no desenvolvimento de condições pré-malignas, denominadas *neoplasias intraepiteliais cervicais* (NICs) (67,68).

2.2.3 História natural do câncer de colo do útero e resposta imune

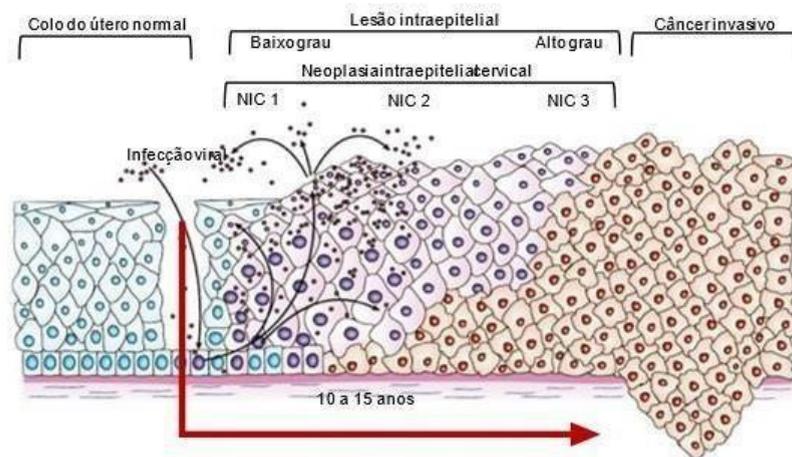
O câncer de colo do útero é uma doença de progressão lenta, sendo precedido por lesões precursoras, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), as quais foram classificadas por Richart em 1967 como neoplasia intraepitelial cervical de grau 1 (NIC1), neoplasia intraepitelial cervical de grau 2 (NIC2) e neoplasia intraepitelial cervical de grau 3 (NIC3) de acordo com grau de comprometimento do epitélio. São caracterizadas pela perda gradual das funções celulares básicas, como controle da divisão celular e capacidade de amadurecimento. Em média transcorrem de dez a 15 anos entre o momento da infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer (69).

Histologicamente o câncer de colo do útero é classificado com base em critérios morfológicos como carcinoma de células escamosas (CEC), que representa cerca de 80% dos casos; adenocarcinoma cervical (ADC), que abrange aproximadamente de 10% a 15% deles; e 5% consistem em outros tipos histológicos. Este último compreende um grupo heterogêneo de subtipos histológicos, endocervicais,

intestinais, células em formato de anel de sinete, além de apresentar tipos mais raros, entre os quais o de células claras, mesotéricas, serosas, endometrioides e do tipo gástrico. Outros carcinomas invasores se apresentam como tumores mistos e contêm células malignas com diferenciação escamosa e glandular, denominados adenoescamosos (ASC) (70–72).

Em virtude de muitas discordâncias entre os diagnósticos citopatológicos e os achados histológicos e aparente dicotomia biológica entre a infecção pelo HPV e a neoplasia, foi realizada em 1988, na cidade de Bethesda, Maryland (EUA), a primeira conferência de consenso para desenvolver uma nova nomenclatura descritiva dos achados da citologia ginecológica quando surgiu então a nomenclatura de Bethesda (73). Essa nova nomenclatura para o diagnóstico citopatológico criou os conceitos de lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e de lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL), das quais a lesão de baixo grau é menos provável de progressão para o carcinoma invasivo, diferentemente das lesões intraepiteliais de alto grau, que são predominantemente causadas por genótipos de HPV oncogênicos. A nomenclatura de Bethesda foi submetida a revisões nos anos de 1991, 2001 e 2014 (74–76). Atualmente, a nomenclatura citopatológica para NIC 1 é LSIL; e para NIC 2 e 3 é HSIL.

A história natural do câncer de colo do útero tem seu início com a infecção do tecido metaplásico na zona de transformação cervical por um ou mais tipos de HPV de alto risco oncogênico, seguida de persistência viral, progressão das lesões precursoras e invasão que ocasiona o câncer (77,78) (**Figura 5**). A persistência do vírus pode ser também influenciada pelo genótipo, pelo tropismo celular e pela capacidade imunológica do hospedeiro em reverter ou não as etapas de progressão das lesões pré-cancerosas após a eliminação viral (79–81).

Figura 5 – Patogênese do câncer de colo do útero

Fonte: Adaptado de Cohen *et al* (2019) (78)

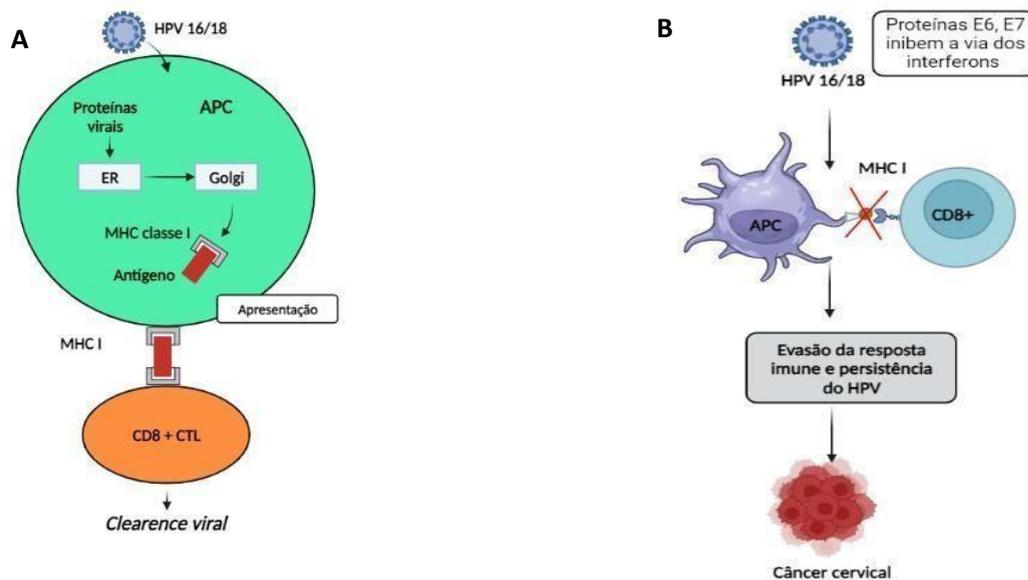
Para infectar e manter a produção viral, o HPV utiliza várias estratégias para evitar sua detecção pelo sistema imune do hospedeiro. Uma delas é que os antígenos virais não sejam detectados, o que minimiza sua exposição ao sistema imunológico; outra estratégia seria a expressão dos genes em baixo número de cópias e apenas em células epiteliais basais. Além disso, ao contrário da maioria dos vírus, o HPV não causa lise celular, o que diminui a probabilidade de células apresentadoras de antígenos (APCs) entrarem em contato com virions e expô-los a células imunes (82).

As proteínas mais imunogênicas do HPV são expressas apenas no epitélio cornificado (queratinócitos), onde as células imunes estão menos presentes (83). No entanto os queratinócitos desempenham uma importante função imunológica e são considerados um tipo não especializado de células apresentadoras de antígenos (APCs.) Eles expressam receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que detectam a presença microbiana e iniciam a sinalização imune inata e adaptativa (84).

O sistema imune inato apresenta um papel importante na defesa antiviral, com ativação do sistema complemento e de células *natural killer* (NK), enquanto a resposta imune adaptativa – composta por anticorpos, células T e interferons (IFNs) – possui um papel importante na indução de um estado antiviral nas células infectadas. Dessa forma, cerca de 90% das infecções pelo HPV sofrem o *clearance* viral e são eliminadas antes do início da formação do câncer (83,85) (**Figura 6A**).

No entanto, existem mecanismos que permitem ao HPV escapar das defesas imunológicas, o que leva à persistência viral, entre os quais um dos principais é a capacidade do vírus de impedir a apresentação do antígeno, com auxílio das proteínas E6 e E7, o que influencia diretamente na via do interferon e leva à diminuição na quantidade de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I na superfície celular dos linfócitos, especificamente os linfócitos TCD8+ citotóxicos (CTLs); estes não conseguem eliminar as células infectadas pela não expressão do MHC de classe I, fato que resulta na inativação de CTLs CD8, o que leva à persistência viral e ao desenvolvimento do câncer cervical (83,85,86) (**Figura 6B**).

Figura 6 – Representação esquemática da resposta imune contra o HPV. **A-** Representação esquemática da resposta imune mostrando o *clearance viral*. **B-** Representação esquemática mostrando a evasão do sistema imune.



Fonte: Adaptado de Steinbach e Riemer (2018) (85). APC – célula apresentadora de antígeno; MHC I – complexo principal de histocompatibilidade tipo I; ER – retículo endoplasmático; CTL – linfócito T citotóxico; CD8+ – células T CD8

A resposta imune local é considerada fator determinante na carcinogênese do câncer de colo do útero após infecção persistente pelo *Papillomavirus* humano de alto risco. A variação que ocorre nos genes durante a resposta imune tem demonstrado influenciar o risco de desenvolver CCU, bem como a progressão e a sobrevida das pacientes (87).

2.2.4 Métodos de diagnósticos do câncer de colo do útero e do HPV

O enfrentamento ao câncer de colo do útero teve significativos avanços após a confirmação do papel etiológico do vírus HPV sobre a doença, cuja infecção pode ser diagnosticada por métodos não moleculares e por detecção de ácidos nucleicos. Os métodos não moleculares são considerados indiretos, pois não detectam a presença do vírus, mas sim as alterações citopatológicas e histopatológicas decorrentes da infecção pelo HPV. São eles: inspeção visual do colo, citopatologia, colposcopia e histopatologia. Os métodos moleculares são tidos como diretos e detectam a presença do DNA do HPV na amostra biológica (88).

2.2.4.1 Métodos não moleculares

O exame clínico – inspeção visual por exame especular – tem como objetivo realizar a exposição do colo do útero permitindo a sua visualização completa e a coleta adequada de material para o exame citológico. Com o advento da inteligência artificial (AVE), cuja aplicação foi relatada em diferentes estudos (89–93) permite a avaliação visual automatizada com uso de algoritmos de AVE para diferenciar imagens com e sem lesões.

O rastreamento do câncer de colo do útero foi implementado no século XX em diversos países, utilizando o diagnóstico morfológico da infecção pelo HPV por meio de esfregaços cervicais (citologia oncológica), conhecido popularmente como exame de Papanicolaou (94). É um exame indolor, de baixo custo e eficaz, sendo utilizado para o rastreamento de mulheres com a finalidade de detectar lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino. Em 1998, o Ministério da Saúde implantou no Brasil um programa nacional de controle do câncer no colo de útero e de mama, denominado “Viva Mulher”, com o objetivo de reduzir as taxas de morbimortalidade por essas neoplasias. No País, o programa destina-se às mulheres de 25 a 64 anos (3,95).

O INCA recomenda que o início da coleta desse exame deve ocorrer aos 25 anos de idade para as mulheres que já tiveram ou têm atividade sexual. Os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual; e, se ambos os resultados forem negativos, os próximos exames devem ser realizados a cada três

anos (95). Porém o teste apresenta um número elevado de resultados falso-negativos, que variam de 15% a 50%; e uma média de 10% de falso-positivos. Cerca de 40% dos casos de câncer de colo do útero ocorrem em mulheres que recentemente receberam um resultado negativo na citologia oncótica (96).

Apesar dessa evidência, estima-se que a triagem citológica sistemática pode reduzir as taxas de morte resultante do câncer de colo do útero em 70% (94). No início dos anos 60, após a implantação de programas organizados de rastreamento, a incidência do câncer de colo do útero apresentou uma queda de mais de 50% na Finlândia, Suécia, Dinamarca e Islândia, bem como nos Estados Unidos da América, com uma redução em 75% dos casos. Nas Américas Central e do Sul a qualidade dos programas de citologia e o acesso ao tratamento são insuficientes e por esse motivo as taxas de incidência e de mortalidade por câncer de colo do útero permanecem altas (94).

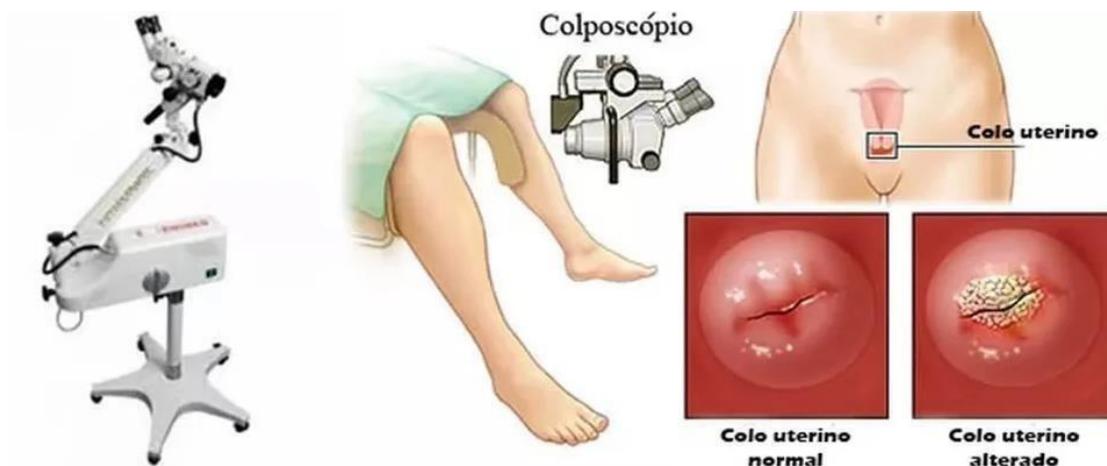
Várias mudanças no rastreio, na prevenção e na gestão do câncer de colo do útero foram vivenciadas ao longo do tempo, entre elas o diagnóstico citológico, com a utilização da citologia em base líquida (LBC), que surgiu para atender às demandas de escrutínio computadorizado (97). Desde a década de 1990, o FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) aprova e recomenda a metodologia de base líquida. Contudo a acurácia da citologia em base líquida foi comparada com a citologia convencional em diversos estudos, e os resultados foram díspares, o que mostra uma melhora na sensibilidade do teste (98,99).

A LBC permite melhor desempenho dos citologistas, pois reduz consideravelmente a proporção de amostras insatisfatórias e diminui o número de elementos que dificultam o diagnóstico como a presença de muco, sangue e células inflamatórias (100). Além disso, a LBC oferece um único meio de coleta de amostras, que preserva os ácidos nucleicos, permite o transporte e o armazenamento das amostras à temperatura ambiente e triagem em algoritmos que incluem o teste de HPV (101).

O exame de colposcopia tem como objetivo analisar de forma detalhada o colo do útero, a vagina e a vulva da mulher e, assim, investigar lesões benignas, pré-malignas e malignas (câncer), utilizando solução de ácido acético (concentração de 3%-5%) com uso de um equipamento chamado colposcópico. Acredita-se que o ácido

acético causa edema do tecido epitelial – em especial do epitélio colunar e quaisquer áreas de epitélio escamoso anormal – e ocasiona uma precipitação reversível das proteínas nucleares e citoqueratinas. Por isso, o efeito do ácido acético depende da quantidade de proteínas nucleares e de citoqueratinas presentes no epitélio. Quando aplicado no epitélio escamoso normal, há pouca precipitação na camada superficial de células, onde os núcleos são escassos. Embora as células mais profundas contenham mais proteínas nucleares, o ácido acético não penetra o bastante; e, portanto, a precipitação resultante não é o suficiente para anular a cor do estroma subjacente. As áreas com neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) apresentam uma precipitação máxima em razão de seu conteúdo maior de proteínas nucleares e impedem a passagem da luz pelo epitélio. Como resultado, o padrão do vaso subepitelial é obliterado, e fica mais difícil de ser visto; o epitélio adquire uma coloração branca (aceto-branca) e produz um efeito perceptível, que contrasta com a cor rosada do epitélio escamoso normal circundante do colo uterino (102) (**Figura 7**). É um teste extremamente valioso para detectar lesões geradas pelo HPV, porém outras situações como inflamação intensa também expressam um epitélio branco. Portanto, existe o risco de diagnosticar uma alteração epitelial que não é causada pelo HPV (96). Entretanto, nos casos em que o médico colposcopista julgar pertinente, pode realizar a biópsia para análise histopatológica.

Figura 7 – Representação esquemática do exame de colposcopia



Fonte: <https://www.colpos.com.br/informacoes-ao-paciente>

O exame histopatológico do colo do útero é o padrão ouro para o diagnóstico de lesões precursoras e neoplásicas do colo do útero. É um norteador para a maioria das decisões terapêuticas (até o momento), auxilia no diagnóstico da infecção pelo HPV, além de ser capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (103). Atualmente, a classificação histopatológica utilizada é a do Sistema Bethesda, que, assim como a Nomenclatura Brasileira de Laudos de Exames Citopatológicos, classifica as células anormais em lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). As lesões de baixo grau usualmente estão relacionadas à replicação ativa do HPV, enquanto as lesões de alto grau incluem a transformação celular, caracterizada principalmente por alterações nucleares (95).

A avaliação histológica de biópsias cervicais (mesmo sendo considerada como o “padrão ouro”) apresenta algumas limitações, visto que existem casos em que o diagnóstico anatomopatológico microscópico não é suficiente para conclusão diagnóstica (104). Nesse sentido, surge a imunocitoquímica com a finalidade de verificar processos neoplásicos de diagnóstico diferencial de vários estágios de carcinomas e processos metaplásicos associados ao HPV. Ki-67, Ciclina D1 e p16INK4a são os mais utilizados, estando associados à expressão E7 do HPV durante a infecção com tipos oncogênicos do vírus e com o produto do gene antiapoptótico p53 (105). Contudo essa técnica não está disponível na maioria dos hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS).

2.2.4.2 Detecção de ácidos nucleicos

Na década de 1980, o diagnóstico molecular do HPV começou a ser utilizado, e desde então há uma tendência mundial em relação à introdução dele no rastreio do CCU (106,107). A utilização de métodos mais acurados para a detecção do HPV em investigações epidemiológicas permitiu a confirmação da importância do vírus, principalmente dos genótipos oncogênicos, como fator principal de risco para o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais e do câncer cervical (106).

A detecção de ácidos nucleicos baseiam-se na detecção de DNA viral por técnicas de biologia molecular e apresentam elevada sensibilidade e especificidade. Pesquisa realizada na Itália com mulheres entre 25 e 60 anos

evidenciou a efetividade dos testes moleculares para DNA do HPV no rastreio do câncer de colo do útero quando comparados ao teste de citologia convencional (108). Bains *et al* (2019) (109) realizaram estudo com o objetivo de avaliar a introdução do teste primário de HPV na Inglaterra e concluíram que a relação custo-efetividade pode ser ainda melhorada por meio da ampliação do intervalo entre os rastreios; demonstraram ainda que essa estratégia poderá aumentar o número de lesões identificadas e tratadas por meio da colposcopia e conseqüentemente levará à diminuição da incidência e da mortalidade pelo câncer de colo do útero.

As técnicas empregadas para detectar o material genético do HPV incluem: hibridização molecular com sondas de ácidos nucleicos, amplificação de sinal como a Captura Híbrida II; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (28,29,107,110,111).

A metodologia da PCR expandiu-se com o desenvolvimento da PCR quantitativa em tempo real, ou *Quantitative Real Time PCR* (qPCR). Essa técnica permite, além da detecção, a quantificação do HPV e de diversos outros agentes infecciosos. Para a detecção do agente patogênico por esse método, não são necessárias etapas pós-amplificação (eletroforeses ou hibridizações); ele baseia na irradiação de sinais fluorescentes contínuos, que são emitidos dentro das placas de reações ao longo dos ciclos de amplificação em virtude da presença de reagentes que emitem luz à medida que ocorre amplificação do DNA do HPV. Há vários sistemas para detecção desses produtos de PCR, entre os quais os mais utilizados são o sistema TaqMan®, que utiliza sondas; e o sistema do corante SYBR® Green, um intercalante de DNA. Os resultados, que podem ser monitorados em tempo real pelo operador na forma de gráficos, verificam tanto a positividade no momento do ciclo da reação – no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite (*cutoff/threshold*) – quanto a negatividade (112).

Atualmente, a PCR digital (ddPCR) é uma nova ferramenta de diagnóstico que adota uma abordagem fundamentalmente diferente para quantificar o número de moléculas de DNA em uma amostra. Nesse método a reação de amplificação é dividida em milhares de partições independentes. O particionamento pode ser obtido usando placas de micropoços, capilares, emulsões de óleo ou matrizes. Esse particionamento ocorre de forma que cada mistura da reação individual contenha uma única molécula-alvo ou nenhuma. As reações particionadas são então amplificadas até o ponto final, e o número de partições positivas (fluorescentes) e negativas é

contado de forma que o número de cópias na amostra pode ser calculado (113,114). As plataformas ddPCR comerciais atuais particionam amostras usando gotículas de água em óleo; e, tal como acontece com qPCR, todas requerem extração prévia de ácido nucleico da amostra, otimização do *primer* de PCR e concentração da sonda (115,116). Apesar de oferecer várias vantagens específicas, o alto custo dificulta sua implementação na rotina laboratorial. No entanto o rendimento mais baixo e os tempos de resposta mais longos dos sistemas ddPCR atuais em comparação com o qPCR dificultam sua implementação na rotina laboratorial. Por sua vez, existem algumas aplicações para as quais o ddPCR supera o qPCR e deve ser considerado como em ensaios que exigem alta precisão para medição da carga viral, testes de amostras que contêm inibidores de amplificação por PCR e detecção de sequências raras (116).

A metilação do DNA tem-se mostrado promissora como teste de triagem para lesões precursoras do câncer de colo do útero, especialmente em mulheres hrHPV positivas. Alterações nos níveis de metilação do promotor de vários genes (humanos e parte do genoma do HPV) foram associadas ao *status* do HPV e à progressão da lesão. Contudo, os relatos na literatura são caracterizados pela heterogeneidade dos cenários de estudo, populações, estratégias metodológicas, detalhes técnicos e valores de corte utilizados, entre outras variáveis, o que dificulta uma visão abrangente do desempenho desses testes e sua real utilidade clínica. Apesar de um desempenho muito promissor demonstrado em estudos individuais, o fato é que tais testes baseados em metilação ainda não passaram da pesquisa para a prática clínica (117–119).

2.2.5 Vacinas

A vacinação contra o HPV é uma abordagem eficiente para prevenir o câncer de colo do útero, especialmente nos países em desenvolvimento e nas regiões onde a triagem do CCU não é viável (120–122). As primeiras vacinas bivalentes e quadrivalentes contra o HPV foram disponibilizadas em 2006, e cada uma delas demonstrou mais de 90% de eficácia na prevenção do HPV 16 e 18. A bivalente foi desenvolvida para proteção contra o HPV16 e 18 (123) e a quadrivalente, além de proteger contra o HPV 16 e 18, protege contra o HPV6 e o HPV11, responsáveis pelas verrugas genitais e pela papilomatose respiratória recorrente (124,125). A

nonavalente é a mais completa e a mais recente disponível no mercado brasileiro; é ativa contra os HPVs 6/11/16/18/ 31/33/ 45/52/ 58, responsáveis por 90% dos casos de câncer cervical no mundo (123,124).

Nos países onde os programas de vacinação contra o HPV foram introduzidos, são esperadas reduções substanciais na incidência de câncer de colo do útero. Na Austrália, o primeiro país a estabelecer um programa de vacinação contra o HPV (em 2007), foi utilizada a vacina quadrivalente com mais de 70% de cobertura vacinal em meninas e meninos de 12 e 13 anos. Dentro do período de três anos da implementação do programa, foi observada redução de 38% na displasia cervical de alto grau em mulheres acima de 18 anos de idade (126,127). Em países onde pelo menos 50% das mulheres elegíveis foram vacinadas, as infecções por HPV 16 e 18 diminuíram quase 70% (128).

No Brasil, as três vacinas contra o HPV foram aprovadas e registradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e estão comercialmente disponíveis. O Estado do Amazonas foi o primeiro no País a disponibilizar a vacina bivalente contra HPV no SUS a partir do ano de 2013. No restante do Brasil, o Ministério da Saúde incorporou ao SUS, em 2014, a vacina quadrivalente. A implementação da vacinação no Programa Nacional de Imunização (PNI) foi sucessiva: em 2014 a vacina foi ofertada para as adolescentes de 11 a 13 anos; em 2015 houve expansão para as meninas/adolescentes de nove a 13 anos e também foi contemplada a população feminina de nove a 26 anos vivendo com HIV/Aids; em 2017 a vacinação foi ampliada para as meninas/adolescentes de nove a 14 anos e incluída para a população masculina de 11 a 14 anos e de nove a 26 anos de idade vivendo com HIV/Aids, além de indivíduos submetidos a transplantes de órgãos sólidos/medula óssea e pacientes oncológicos da mesma faixa etária. Em 2021, mulheres imunossuprimidas até 45 anos foram incluídas. Em 2022, ocorreu a ampliação da vacinação para meninos de nove e dez anos e para homens imunossuprimidos com até 45 anos. Em 2024, a vacina contra o HPV passou a ser administrada em dose única para crianças e adolescentes de 9 a 14 anos (129).

Atualmente, a cobertura vacinal contra o HPV para a população feminina em nível mundial para a 1.^a dose é de 55%; e para a 2.^a dose, em torno de 44%. No Brasil, para essa mesma população esse percentual é de 75,9% para a 1.^a dose; e 57,44% para a 2.^a dose. No Estado do Amazonas, para essa mesma população, a cobertura

para a 1.^a dose é 81,52%; e é de 61,94% para a segunda dose, conforme dados referentes ao ano de 2022 (130).

Diante desses números é de suma importância intensificar esforços para melhorar a adesão aos esquemas recomendados de vacinação contra o HPV e assim obter cobertura suficiente. A estratégia proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para eliminar a doença como problema de saúde pública inclui, entre suas metas, que até 2030 devem ser alcançadas 90% das meninas totalmente vacinadas contra HPV aos 15 anos (49).

2.2.6 Estadiamento e tratamento do câncer de colo do útero

O estadiamento do câncer de colo do útero foi o primeiro sistema de classificação em estádios para uma doença neoplásica maligna, tendo sido proposto em 1928. É realizado por meio da classificação recomendada pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) e/ou pelo sistema tumor, nódulo e classificação da metástase (TNM) da American Joint Committee on Cancer (AJCC) (131).

Em 1950, no Congresso Internacional de Ginecologia, em New York, foi definida a “International Classification of the Stages of the Uterine Cervix”; e até 1994 foram realizadas sete modificações nesse sistema, a maioria delas relacionadas às subdivisões do estágio I, especialmente após o reconhecimento do conceito de microinvasão (132,133).

Em 2018 a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) realizou a última revisão do estadiamento e propôs modificação na subdivisão do estágio IIA em IIA1 e IIA2. O mais recente sistema de estadiamento referendado pela FIGO está descrito no **Quadro 1**.

O sistema TNM descreve a extensão anatômica da doença com base na avaliação de três componentes: o tumor (T), avaliando a extensão do tumor primário; os linfonodos (N), verificando a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; e a metástase (M), observando a ausência ou a presença de metástase a distância (134).

Nos casos de carcinoma escamoso estágio IA1 sem invasão vascular, a conização é o tratamento padrão em mulheres que desejam preservar a fertilidade, contudo a histerectomia total pode ser realizada como opção terapêutica em mulheres com prole definida ou naquelas menopausadas. Nos casos de adenocarcinomas estágio IA1 sem invasão vascular, a conduta permanece controversa, e tratamentos conservadores como conização têm sido indicados com mais reserva (135–137). Para mulheres com carcinoma e adenocarcinoma em estágio IA2, a histerectomia radical modificada com linfadenectomia pélvica é o tratamento padrão (138,139).

Quadro 1 – Estadiamento do câncer de colo do útero, Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia – FIGO, 2018

Estadiamento	Descrição
I	O carcinoma está estritamente confinado ao colo do útero (a extensão para o corpo uterino deve ser desconsiderada)
IA	Carcinoma invasivo que pode ser diagnosticado apenas com microscopia, com profundidade máxima de invasão <5mm
IA1	Invasão do estroma <3mm de profundidade
IA2	Invasão estromal ≥ 3mm e <5mm de profundidade
IB	Carcinoma invasivo confinado ao colo uterino, com invasão mais profunda de medida ≥ 5mm
IB1	Tumor mede <2cm em sua maior dimensão
IB2	Tumor mede ≥2cm e <4cm em sua maior dimensão
IB3	Tumor mede ≥4cm em sua maior dimensão
II	Carcinoma invade além do útero, mas ainda não se estendeu para o terço inferior da vagina ou para a parede pélvica
IIA	Limitado aos dois terços superiores da vagina sem envolvimento parametrial
IIA1	Tumor mede <4cm em sua maior dimensão
IIA2	Tumor mede ≥4cm em sua maior dimensão
IIB	Com envolvimento parametrial, mas não até a parede pélvica
III	O carcinoma envolve o terço inferior da vagina e/ou estende-se à parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcional e/ou envolve gânglios linfáticos pélvicos e/ou para-aórticos
IIIA	Envolve o terço inferior da vagina, sem extensão para a parede pélvica
IIIB	Extensão para a parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não funcionante por tumor

IIC	Envolvimento de gânglios linfáticos pélvicos e/ou para-aórticos, independentemente do tamanho e da extensão do tumor
IIC1	Apenas metástase de linfonodo pélvico
IIC2	Metástase linfonodal para-aórtica
IV	O carcinoma se estendeu além da pelve verdadeira ou envolveu (comprovada por biópsia) a mucosa da bexiga ou do reto
IVA	Disseminação para órgãos pélvicos adjacentes
IVB	Disseminação para órgãos distantes

Fonte: Adaptado de Lee e Atri (2019) (140).

A histerectomia radical com linfadenectomia pélvica bilateral (com ou sem biópsia de linfonodo sentinela) é o tratamento preferencial para carcinoma escamoso e para adenocarcinoma estágio IB1, podendo ser realizada nos estádios IB2 e, eventualmente, IIA1(141,142). A necessidade de tratamento adjuvante após cirurgia dependerá do resultado das peças cirúrgicas: volume tumoral, invasão do estroma, invasão vascular, margens vaginais e parametriaes e invasão linfonodal. Pacientes que apresentam margens vaginais e parametriaes comprometidas e invasão linfonodal são consideradas de alto risco para recidivas. Em ambos os casos, a terapia adjuvante com radioterapia (RT) associada à quimioterapia (QT), em um esquema conhecido como *quimiorradiação*, é indicada para reduzir o risco de recidivas locais e metástases a distância (143–145).

Para os estádios clínicos IB3, IIB, III e IVA a radioterapia e a quimioterapia formam os pilares do tratamento do câncer de colo do útero localmente avançado desde 1999 quando a Food and Drug Administration (*FDA*) recomendou a adição de quimioterapia baseada em platina concomitantemente à radioterapia no tratamento dessas pacientes (146).

2.3 Recidiva e persistência do câncer de colo do útero

O diagnóstico de falência do tratamento, seja de persistência (período menor ou igual a seis meses após o término do tratamento), seja de recidiva de doença (período maior de seis meses após o término do tratamento), pode ser clínico

(utilizando exame físico ou exame de imagem) ou cito-histopatológico com biópsias; estas muitas vezes dificultadas em virtude de estenoses do canal vaginal, consequentes do tratamento radioterápico (147,148). No entanto a distinção entre persistência e recidiva tem implicações prognósticas.

Cerca de 30% das pacientes apresentarão falha no tratamento, persistência ou recidiva, com sobrevida de cinco anos, que pode variar de 3,2% a 13,0%. O risco dessa falha no tratamento aumenta quando o diagnóstico ocorre em estágio mais avançado (149).

A caracterização de recidiva/persistência da doença poderia estar relacionada à dificuldade na avaliação clínica durante a condução terapêutica por não ser detectada na maioria das consultas de acompanhamento; e geralmente resulta em um prognóstico de sobrevida ruim. Os dados da literatura variam muito quanto aos principais fatores que influenciam a sobrevida e o valor prognóstico favorável, o que dificulta estabelecer quais são os fatores mais importantes a serem avaliados para estabelecer o manejo clínico ideal (150).

A classificação do tipo de recidiva do CCU é baseada no local onde o tumor recorrente é identificado e é classificada como locorregional, distante ou linfonodal (151–153).

O seguimento das pacientes tratadas é guiado pela avaliação clínica, sendo os exames de imagem realizados quando há suspeita clínica de persistência ou de recidiva da doença, preferencialmente direcionados às queixas da paciente e eventualmente acompanhados de confirmação histológica (150,154–156). Aproximadamente um terço das mulheres tratadas para câncer cervical apresentará recidiva durante o *follow up* (157), com a maioria ocorrendo nos primeiros dois a três anos após o tratamento (155,158).

O tratamento da recidiva/persistência da doença é semelhante ao do tumor primário e dependerá de cada caso (dependendo do tratamento prévio e do local onde a recidiva foi detectada), podendo ocorrer por cirurgia, quimioterapia, radioterapia (159).

Há pesquisas que avaliam a possibilidade do uso do teste de cf-DNA HPV na vigilância de recidiva/persistência da doença. Em um estudo retrospectivo foram

analisadas pacientes tratadas para o CCU para verificar o papel da detecção de cf-DNA HPV de alto risco em prever recidiva da doença no seguimento, em amostras de citologia líquida. Das pacientes que recidivaram, 42% apresentaram resultado positivo no teste de HPV de alto risco no período de seguimento, enquanto a citologia cérvico- vaginal apresentou capacidade limitada em prever recidiva (5,7%); já a combinação da citologia com o teste para HPV de alto risco aumentou a sensibilidade do teste para 89,3%. Em relação às recidivas, a presença do HPV de alto risco precedeu seu diagnóstico, variando de 0 a 11 meses, com média de 2,8 meses. Dessa forma, sugerem que a persistência de HPV de alto risco no seguimento seja um fator de risco para a recidiva da doença (160).

Desse modo, reforça-se o valor de um teste molecular, somado a outros disponíveis como o diagnóstico por imagem, no *follow up* de pacientes submetidas a tratamento a fim de identificar aquelas com maior probabilidade de recidiva ou de persistência da doença e assim monitorar a resposta terapêutica.

2.4 Biópsia líquida

As abordagens diagnósticas no tratamento do câncer destinam-se à triagem, à detecção precoce, à estratificação de risco, à seleção de terapia eficaz, ao monitoramento da resposta ao tratamento e à prevenção da recidiva da doença. Na oncologia, em alguns casos, as ferramentas atuais de tomada de decisão são limitadas, o que leva a sobrediagnósticos, falso-positivos e baixa especificidade (particularmente com biomarcadores séricos como o CA125 (161–163). Como resultado, as modalidades de imagem padrão geralmente fornecem detecção de tumor apenas em estágios avançados da doença (164). Além disso, o “padrão ouro” para o diagnóstico de câncer é a biópsia de tecido, que é um procedimento invasivo associado a desconforto e a risco de possíveis complicações (165,166). Ademais, a acessibilidade dos tumores para biópsia é limitada e não reflete a heterogeneidade intratumoral ou o surgimento de novos subclones durante a evolução do tumor (167,168). Em vista disso, surge a biópsia líquida como uma abordagem promissora que pode superar essas deficiências (169,170).

A biópsia líquida possui uma abordagem minimamente invasiva para a detecção de marcadores derivados de tumores com significado prognóstico ou diagnóstico em fluidos corporais (171). A definição de biópsia líquida se aplica a:

- células tumorais circulantes;
- ácidos nucleicos extracelulares circulantes, incluindo DNA livre de células (cfDNA), mRNA e microRNA (miRNA);
- vesículas extracelulares (por exemplo, exossomos);
- nucleossomos;
- várias glicoproteínas e antígenos (por exemplo, PSA, CEA, CA 125, CA19-9, β HCG, α FP etc.).

Estudos de cfDNA em oncologia são predominantemente direcionados a aplicações clínicas como um biomarcador tumoral. Uma associação do nível de cfDNA com o resultado do tratamento e a implementação de técnicas de alto rendimento tornam a biópsia líquida – usando DNA extracelular – um candidato atraente para um teste de rotina no tratamento do câncer. No entanto ainda é necessário estimar a significância prognóstica, padronizar e validar ensaios clínicos prospectivos de larga escala (172,173). Além disso, apesar do aumento de estudos que implicam a importância do cfDNA em oncologia, uma série de questões não resolvidas permanecem sobre a sua natureza, seus subtipos, seus mecanismos de liberação e sua eliminação em pacientes com câncer (174).

2.5 DNA livre-circulante (*cell-free* DNA ou cfDNA)

O cfDNA é o DNA que circula livremente no sangue e pode ou não ser de origem tumoral. Sua descoberta no plasma desencadeou diversas possibilidades de diagnóstico não invasivo, monitoramento e prognóstico de doenças. Esse fato possibilitou utilizar esse teste diagnóstico em diversas áreas da medicina (175).

Foi demonstrado que a quantidade total de cfDNA era maior em pacientes com câncer do que em indivíduos saudáveis. No entanto níveis aumentados de cfDNA não foram específicos para malignidades, já que níveis elevados também foram detectados no plasma de mulheres grávidas e em pacientes que receberam transplantes (176,177). O cfDNA elevado também pode refletir processos fisiológicos; por exemplo, exercício físico; e não malignos, como inflamação, diabetes, trauma tecidual, sepse e infarto do miocárdio (166,178).

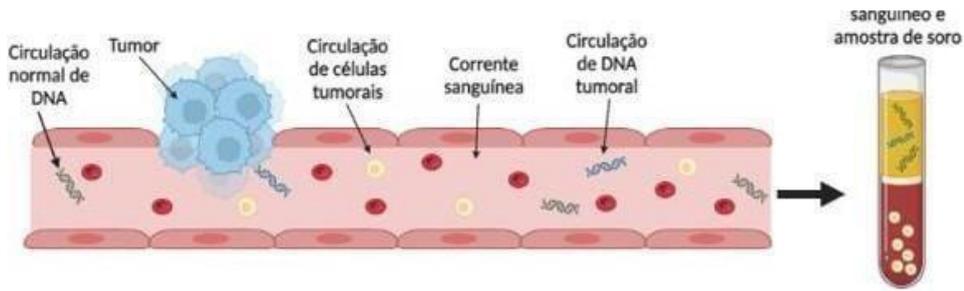
Na década de 60, foi evidenciado que pacientes com lúpus eritematoso sistêmico também apresentavam grandes quantidades de cfDNA no plasma (179). A primeira associação entre cfDNA e câncer foi relatada em 1977 por Leon *et al* (1977) (180), que observaram que, no soro de pacientes com vários tipos de câncer, havia um nível mais elevado de cfDNA em comparação com indivíduos saudáveis. Constataram que pacientes com metástases apresentaram um nível mais elevado de cfDNA. Notaram ainda que, após a radioterapia, os níveis de cfDNA diminuíram enquanto constantes níveis aumentados de cfDNA foram associados a pior sobrevida ou recorrência do tumor, o que levou à hipótese de que o cfDNA no soro poderia permitir avaliação da resposta terapêutica. Contudo, apenas no final dos anos 80 é que foi observado e relatado que o cfDNA plasmático apresentava alterações que estavam associadas ao tumor (181).

Na década de 90, inúmeras alterações foram identificadas como a detecção de fragmentos do gene RAS mutado no sangue de pacientes com câncer. Essas alterações genéticas podem significar alta expressão de oncogenese, pequena expressão de genes supressores de tumores, alterações de microsátélites, integridade de sequências repetidas do DNA genômico não codificante, alterações do DNA mitocondrial. Outras alterações não genéticas encontradas também foram associadas ao tumor como mudanças epigenéticas (hiper ou hipometilação de genes) e níveis aumentados de cfDNA em pacientes com câncer em relação a pacientes saudáveis (166,182–184).

O cf-DNA ocorre no soro, no plasma e em outros fluidos corporais como urina ou saliva (185,186). O mecanismo de sua liberação na corrente sanguínea não é completamente compreendido (**Figura 8**). Acredita-se que sejam liberados por meio da morte de células tumorais por apoptose e necrose ou por secreção pela própria célula. Macrófagos podem fagocitar células necróticas e apoptóticas e liberar o DNA

ingerido no microambiente tumoral. Acredita-se que células de tumor que circulam no sangue e micrometástases também podem liberar material genético (166,187).

Figura 8 – Esquema sobre o princípio da biópsia líquida



Fonte: Adaptado de Cervena, Vodicka e Vymetalkova (2019) (179)

O tipo de eliminação pode ser distinguido em processos apoptóticos ou necróticos comparando o tamanho dos fragmentos dos ácidos nucleicos extracelulares circulantes produzidos. Células que sofrem apoptose (morte celular programada) apresentam uma degradação fisiologicamente orquestrada do DNA genômico, que resulta em fragmentos pequenos e uniformes (~180-200 pares de bases). Contudo, na necrose celular, há formação de uma grande variedade de fragmentos com tamanhos diversos resultantes da digestão ao acaso (187).

A quantidade de DNA presente no sangue varia de acordo com a capacidade de eliminação, de degradação e de outros eventos fisiológicos da circulação sanguínea e linfática. De acordo com a maioria dos estudos quantitativos o cfDNA é observado em indivíduos saudáveis em concentrações entre 0 e 100ng/ml de sangue, com uma média de 30ng/ml, enquanto em pacientes com câncer a concentração no plasma ou no soro varia entre 0 e 1000ng/ml, com média de 180ng/ml (180,188,189).

Estudos mostram que a forma como o DNA se encontra livre no sangue (fita dupla e circular ou fita simples e linear) influenciará a sua permanência. DNAs de fita dupla e circular podem permanecer por mais tempo do que DNAs de fita simples e linear (166).

Vários estudos que tiveram como objetivo comparar os níveis de DNA em amostras pareadas de plasma e soro observaram que, no plasma, as concentrações de DNA foram significativamente maiores, o que proporcionou um melhor isolamento para a análise do DNA. Entretanto interferentes como a lise (hemólise) de glóbulos vermelhos, a qual pode ocorrer durante a coleta inadequada de amostras, armazenamento por períodos de tempo mais longos (> 6h) ou processamento mecânico do sangue que causa ruptura das hemácias e liberação de seu conteúdo (incluindo DNA) no fluido, podem comprometer os níveis de DNA (190–192). Esse aumento de DNA de células nucleadas pode dificultar a análise de cfDNA. Com isso, os resultados dos testes são menos precisos. Embora alguns estudos apoiem o uso de soro em vez de plasma, pesquisas afirmam que a análise de cfDNA da fração plasmática do sangue coletado é preferível ao soro (179,193,194).

Estudos subsequentes realizados em pacientes com câncer identificaram várias alterações, como grande quantidade de cf-DNA plasmático, alta expressão de oncogenes, pequena expressão de genes supressores de tumores, mudanças epigenéticas ou detecção de RNA plasmático (182,184,195).

O cfDNA carrega informações sobre a dinâmica das alterações genéticas e epigenéticas específicas do câncer (196). Foi demonstrado que o nível de cfDNA durante o tratamento estava correlacionado com a resposta terapêutica (197,198). Alguns estudos sugeriram que as análises de cfDNA superaram os métodos convencionais (como a tomografia computadorizada), exigiram uma menor carga tumoral e prolongaram a janela de tempo para a tomada de decisões clínicas (198,199).

No caso dos cânceres com etiologia viral, por exemplo, carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkkit e doença de Hodking associados à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), carcinoma hepatocelular associado ao vírus da hepatite B (HBV) e câncer de colo do útero e carcinoma de células escamosas da orofaringe – os dois últimos causados pela infecção por HPV –, a detecção do genoma viral no plasma ou no soro dos pacientes pode ser útil como ferramenta para detecção precoce de recidiva/persistência e monitoramento do tratamento (166,184,200). No entanto, em pacientes com câncer de colo do útero, estudos demonstram que a carga viral plasmática do HPV é baixa, mas é específica para esse tipo de câncer (201–205).

Ho *et al* (2005) (206) avaliaram a detecção do DNA do HPV genótipos 16, 18 e 52 no sangue periférico de pacientes com CCU para determinar sua importância prognóstica e observaram durante o *follow up* que oito de dez pacientes com CCU e DNA viral detectado no sangue apresentaram recidiva três meses após o tratamento; e uma alta porcentagem (87,5%, 7/8) dessa recorrência envolveu metástases a distância. Também foi relatado que pacientes com CCU apresentavam maior carga viral plasmática que os com carcinoma *in situ* (203).

O HPV apresenta ciclo viral local (epitélio cervical), o que pode afetar os níveis de DNA plasmáticos. Em células malignas, apresenta-se na forma integrada ao genoma da célula hospedeira. A baixa taxa de detecção (aproximadamente 20 a 30%) e o número de cópias de DNA viral no plasma (1 a 35 cópias/mL) sugerem que o mecanismo de liberação do DNA tumoral para a circulação seja menos eficiente (207). Dessa forma, o processo de liberação do material genético do tumor para a circulação é menos eficaz, o que ocorreria em estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer, quando é esperada a presença de metástases. Em virtude disso, os estudos indicam a associação entre a detecção do genoma do HPV no plasma e a presença de metástase (207,208).

As técnicas de detecção do genoma viral no plasma das pacientes podem ser importantes tanto para a detecção de estágios mais avançados do câncer quanto para o monitoramento do tratamento. Estudos têm demonstrado que, após o tratamento, o genoma viral não é mais detectado no plasma de pacientes que apresentam resposta completa à terapia, porém podem continuar a ser detectado ou ressurgir em pacientes com doença persistente, metástase ou recidiva (205,209,210).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de colo do útero (CCU) é uma das neoplasias malignas mais comuns entre as mulheres em todo o mundo, e a infecção persistente pelo HPV de alto risco (HR-HPV) é considerada como fator importante para a ocorrência desse tipo de patologia. No Brasil, o CCU é a quarta causa mais frequente de morte por câncer nas mulheres, e o Amazonas é o estado brasileiro com maior incidência.

Sabe-se que um terço das pacientes tratadas poderão apresentar recidivas ou persistência da doença. Durante os dois primeiros anos após o tratamento, até 85% das recidivas/persistências podem ser diagnosticadas precocemente. Em virtude disso, o *follow up* de mulheres, após o tratamento primário, é importante e imprescindível.

A relação da presença do DNA circulante do HPV no plasma de pacientes com o câncer do colo do útero já foi descrita. Nesse sentido, o DNA circulante do HPV detectado em biópsia líquida é um biomarcador promissor para o diagnóstico precoce de recidiva/persistência da doença e progressão tumoral. Assim sendo, estudos que avaliam esse marcador em amostras de plasma de pacientes com diagnóstico de câncer de colo do útero trarão grande valor ao acompanhamento da resposta terapêutica e poderão contribuir como instrumentos de análise de prognóstico e como fatores decisórios para a conduta terapêutica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Analisar a presença do DNA circulante do HPV no plasma como marcador preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do câncer de colo do útero.

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Caracterizar o perfil sociodemográfico, epidemiológico e clínico da população estudada.

4.2.2 Descrever a frequência de positividade do DNA circulante do HPV no plasma antes e durante o tratamento para câncer de colo do útero.

4.2.3 Descrever a frequência de casos de recidiva/persistência do câncer de colo do útero na população estudada.

4.2.4 Descrever a sobrevida global das pacientes com câncer de colo do útero em seguimento incluídas no estudo.

4.2.5 Relacionar os dados clínicos (estadiamento) e histopatológicos das pacientes com a presença dos marcadores utilizados no seguimento das pacientes estudadas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo que descreveu a presença do DNA circulante do HPV no plasma como marcador preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do câncer de colo do útero.

5.2 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, hospital referência no diagnóstico e no tratamento de câncer em toda a Amazônia Ocidental, e a etapa de recrutamento se deu no período de 31 de agosto de 2020 a 30 de setembro de 2022.

5.3 População de estudo

O estudo foi realizado em mulheres com diagnóstico de carcinoma invasor de colo do útero, mediante consentimento prévio, atendidas na FCECON, com indicação de tratamento cirúrgico ou não cirúrgico.

5.4 Amostragem

A amostragem foi definida levando-se em consideração o total de mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero registradas na FCECON durante o ano de 2017, que foi de 330 de casos (FCECON, 2018); e a prevalência do DNA do HPV no sangue periférico, encontrada em estudo realizado por Centrone (2016) (211), que foi de 58,8%.

No entanto é observada na prática clínica entre as pacientes da FCECON uma perda de seguimento de cerca de 35% em virtude de que muitas mulheres são provenientes do interior do Estado do Amazonas ou de regiões e que, após conclusão

da fase dos procedimentos terapêuticos iniciais, têm dificuldades para retornar para as consultas de seguimento.

O estudo não envolveu mulheres com doença metastática ao diagnóstico (FIGO IV-B) e previu que o seguimento ocorreria em quatro momentos: fase zero (antes do início do tratamento), fase 1 (em torno de seis meses após o início do tratamento), fase 2 (em torno de nove meses após o início do tratamento) e fase 3 (em torno de 18 meses após o início do tratamento). Em cada fase haveria a coleta das amostras e consequentemente as análises, o que elevaria os custos do estudo. Assim sendo, respeitando todos os critérios acima demonstrados, bem como a viabilidade econômica para a execução do estudo, a amostra esperada para esta pesquisa foi de **60 pacientes**, distribuídas em dois grupos, conforme o **Quadro 2**.

Quadro 2 – Caracterização dos grupos de pacientes

GRUPO	CLASSIFICAÇÃO FIGO *	Nº DE PARTICIPANTES
Grupo A	IA a IIB	30 amostras de pacientes portadoras do câncer de colo do útero
Grupo B	IIIA a IVA	30 amostras de pacientes portadoras do câncer de colo do útero

FIGO*: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

As mulheres acometidas por câncer de colo do útero foram inseridas de forma aleatória à medida que se apresentaram para atendimento na FCECON.

5.5 Critérios de elegibilidade

- Critérios de inclusão:

Mulheres com idade maior ou igual a 18 anos.

Mulheres com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma invasor de colo de útero, estadios IA a IVA.

Mulheres positivas para HPV 16 e/ou para 18 na lesão tumoral (tecido ou material cérvico-vaginal).

Mulheres virgens de tratamento.

- Critérios de exclusão:

Mulheres que no re-estadiamento apresentaram doença metastática para além da pelve ao diagnóstico (FIGO IV-B).

Mulheres portadoras de outras neoplasias em outros sítios anatómicos.

5.6 Métodos a serem aplicados e materiais a serem utilizados

5.6.1 Procedimentos de abordagem a paciente com câncer de colo do útero, coleta de dados clínicos e epidemiológicos

A seleção das pacientes foi realizada inicialmente por meio de consulta ao Relatório Analítico de Agendamentos, procedente do sistema I-doctor, cuja permissão foi possível mediante senha individual e do mapa cirúrgico semanal com acesso por meio da equipe de enfermagem do centro cirúrgico. Esses documentos permitiram identificar a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID). Com essa informação preliminar, as pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão foram abordadas na consulta ambulatorial ou no leito, no dia anterior ao procedimento cirúrgico, oportunidade na qual receberam uma explicação sobre o objetivo do projeto, seus riscos e seus benefícios. Logo após, foram convidadas a participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A).

Nesse momento, também foi aplicado um questionário (Apêndice B), no qual foram coletados dados sociodemográficos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV, bem como características da lesão obtidas durante o acompanhamento da paciente na consulta médica ou pela busca de informações nos prontuários.

Sabe-se que a distinção entre recidiva e persistência tem implicações prognósticas. A recidiva é definida como reaparecimento do tumor ou desenvolvimento de doença metastática mais de seis meses após o término do tratamento, enquanto a persistência é detectada em período inferior a seis meses após o término do tratamento (212). Contudo, para este estudo, caracterizou-se como recidiva/persistência da doença a presença de sinais e de sintomas (como

sangramento vaginal persistente, dor abdominal com queixas urinárias e intestinais) descritos na evolução clínica, consultados nos prontuários das pacientes. Essa análise levou em consideração as observações médicas sobre estado clínico da paciente, bem como os exames histopatológicos e/ou de imagens do seguimento terapêutico.

5.6.2 Procedimentos de coleta e conservação das amostras biológicas

A coleta de tecido na fase zero (antes do tratamento) ocorreu, sempre que houve indicação clínica, no ambulatório, durante a primeira consulta da paciente; ou no centro cirúrgico, durante o ato cirúrgico (o material foi separado para o estudo antes do armazenamento do tecido no formol como de rotina do serviço). Os procedimentos foram realizados pela equipe de cirurgiões pélvicos da FCECON. O tamanho do fragmento coletado foi de aproximadamente três a cinco milímetros de tecido tumoral. Foram evitadas as áreas necrosadas, e o material foi retirado do cerne da lesão. O material coletado foi armazenado imediatamente, sem nenhum conservante, em microtubos de 2,0mL livres de DNAase e RNAase e congelados a -30°C . As amostras foram armazenadas no laboratório de biologia molecular da FCECON até o momento da extração do DNA.

A amostra de sangue foi coletada em tubos PPTTM (*Plasma Preparation Tube*) PLUS (BD Vacutainer®, USA) com gel separador de 5mL por punção venosa e processada para obtenção do plasma, dentro de duas horas após a coleta, por meio de centrifugação a 1.400-1.600g por dez minutos; o plasma foi separado em alíquotas e armazenadas a -30°C . Antes da extração de DNA, uma segunda centrifugação de alta velocidade de 16.000g por dez minutos a 4°C foi realizada para garantir a eliminação de restos celulares.

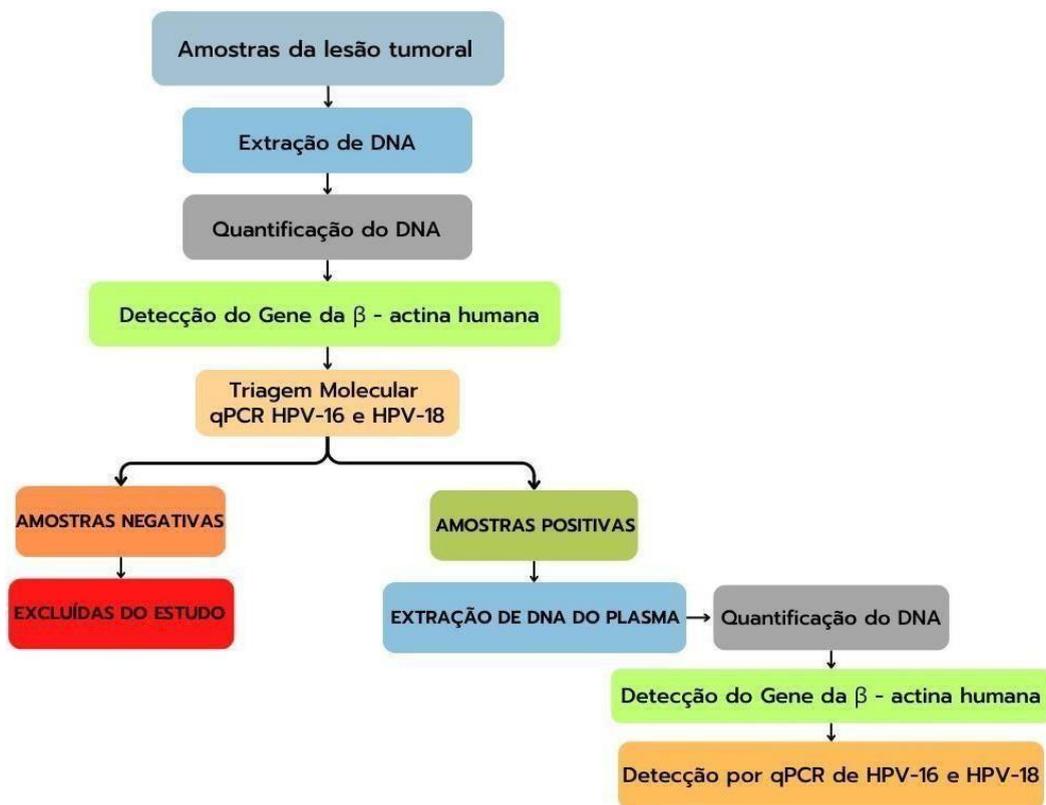
O material cérvico vaginal foi coletado nos casos em que a paciente foi indicada para tratamento não cirúrgico, sem indicação clínica para coleta de fragmento de tecido tumoral; a coleta ocorreu no ambulatório utilizando-se a escova Cervex-Brush® Combi (Rovers® Medical Devices B.V The Netherlands). Ao término da coleta a cabeça da escova, que é removível, foi acondicionada no frasco contendo solução

conservante de tiocianato de guanidina-4M. O frasco foi levado ao vórtex durante 15 segundos; em seguida separado em alíquotas e armazenado a -30°C .

5.6.3 Procedimento de triagem laboratorial

A triagem molecular para detecção do cf-DNA HPV 16 e 18 foi realizada inicialmente nas amostras provenientes da lesão tumoral (tecido ou material cérvico vaginal). Somente as pacientes cujas amostras de lesão tumoral foram detectáveis para cf-DNA HPV 16 e/ou 18 seguiram para análise do plasma e foram submetidas ao *follow up*. A estratégia diagnóstica encontra-se ilustrada na **Figura 9**.

Figura 9 – Estratégia diagnóstica para detecção do cf-DNA HPV 16 e HPV 18 nas amostras das pacientes com câncer de colo do útero



5.6.4 Extração do ácido nucleico

Tecido – A extração de DNA, a partir do fragmento do tumor, foi realizada utilizando-se o *kit* comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., USA), seguindo instruções do fabricante. Em síntese, o fragmento de tecido foi cortado em pedaços menores e pesado em uma balança analítica a fim de se obterem 25mg de amostra; em seguida foi adicionado o tampão de lise de tecido e proteinase K. A mistura foi incubada a 56°C *over night* até que ocorresse a lise total do tecido. Após a incubação, foram seguidas as instruções do fabricante. O volume final de DNA extraído foi de 200µl, e a alíquota foi armazenada a -30°C.

Plasma – A extração de DNA, a partir do plasma, foi realizada utilizando o *kit* comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega Inc., USA), seguindo instruções do fabricante. Antes da extração os plasmas foram descongelados e submetidos a uma segunda centrifugação de alta velocidade de 16.000g por dez minutos a 4°C para eliminação de restos celulares. Em resumo, foi adicionado ao plasma o tampão de lise celular e proteinase K. A mistura foi incubada a 56°C por 30 minutos no bloco térmico. Após a incubação, foram seguidas as instruções do fabricante. O volume final de DNA extraído foi de 40µl, e a alíquota foi armazenada a -30°C.

Material cérvico vaginal – A extração de DNA, a partir do material cérvico vaginal, foi realizada utilizando-se o *kit* comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega Inc., USA) seguindo instruções do fabricante. Antes da extração as amostras foram descongeladas, colocadas no vórtex por dez segundos e centrifugadas por um minuto a 2000 RPM. O sobrenadante foi removido cuidadosamente. Foi observada e registrada a formação de *pellet*. Em síntese, foi adicionado ao material cérvico vaginal o tampão de lise celular e proteinase K. A mistura foi incubada a 56°C por 30 minutos no bloco térmico. Após a incubação, foram seguidas as instruções do fabricante. O volume final de DNA extraído foi de 60µl, e a alíquota foi armazenada a -30°C.

5.6.5 Quantificação do DNA extraído

A quantificação do DNA extraído das amostras oriundas da lesão tumoral foi realizada por espectrofotometria por meio do equipamento NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA), seguindo os procedimentos operacionais do equipamento.

As amostras de DNA provenientes do plasma (dada a necessidade de quantificação precisa, específica e sensível de DNA) foram quantificadas no fluorímetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA) seguindo as orientações do fabricante.

5.6.6 Detecção do gene da β - actina humana

O controle da extração foi realizado por meio da detecção de DNA genômico humano tendo como alvo o gene da β -actina humana, cuja detecção foi realizada por reação em cadeia da polimerase (qPCR) utilizando-se as sequências *Primer F*: (5' CCATCTACGAGGGGTATGC'3) e *Primer R*: (5' GGTGAGGATCTTCATGAGGTA'3) e sonda (5VIC-CCTGCGTCTGGACCTGGCTG-NFQ 3') (Life Technologies, São Paulo, Brasil) de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Vol.(μ l)	Concentração final
TaqMan Master Mix 2X	5,0	0,8x
<i>Primer F</i> (10 μ M)	0,3	0,3 μ M
<i>Primer R</i> (10 μ M)	0,3	0,3 μ M
Probe (10 μ M)	0,1	0,1 μ M
H ₂ O	1,8	
DNA	2,5	μ g/mL
TOTAL	10	

A ciclagem foi de 50°C por dois minutos e 95 °C por dez minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por um minuto e 60°C por um minuto. Foi utilizado como controle positivo DNA de amostra conhecida e água RNase e DNase-

free para controle da reação. A reação de qPCR foi processada no equipamento QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA), e todas as amostras foram realizadas em duplicata.

5.6.7 Detecção e genotipagem do HPV 16 e HPV 18

As amostras foram submetidas ao ensaio *quantitative real-time* PCR (qPCR) tipo específico, tendo como alvo o gene E7 dos HPV 16 e 18, protocolo adaptado de Veo *et al* (2015) (213). Os ensaios de qPCR foram processados na plataforma QuantStudio™ 5 de PCR em tempo real (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA).

Nos ensaios de *real time* PCR (qPCR) do HPV-16 foram utilizados os seguintes *primers* de oligonucleotídeos: *primer forward* (5'GAT GAA ATA GAT GGT CCAGC3') e *primer reverse* (5'GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C3'), e a sonda (5' FAM-CAA GCA GAA CCG GAC AG-MGB-NFQ) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes	Vol.(µl)	Concentração final
TaqMan Master Mix 2X	6,25	1 x
P HPV 16 E7 (10µM)	0,375	0,3 µM
P HPV 16 E7S (10µM)	0,375	0,3 µM
Probe HPV 16 (10µM)	0,125	0,1 µM
H ₂ O	2,875	
DNA	2,5	µg/mL
TOTAL	12,5	

A ciclagem foi de 50°C por dois minutos e 95°C por dez minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por um minuto e 60 °C por um minuto. Foi utilizado como controle positivo DNA de células SiHa e água RNase e DNase-free para controle da reação. A reação de qPCR foi processada no equipamento QuantStudio™ 5(Thermo Fisher Scientific© Inc, USA), e todas as amostras foram realizadas em duplicata.

Para os ensaios de qPCR do HPV-18 foram utilizados os seguintes *primers* de oligonucleotídeos: *primer forward* (5' AA GAA AAC GAT GAA ATA GAT GGA 3') e *primer reverse* (5' GGC TTC CAC CTT ACA ACA CA 3'), e a sonda (5' VIC-AAT CAT CAA CAT TTA CCA GCC-MGBNFQ 3') (Life Technologies, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo:

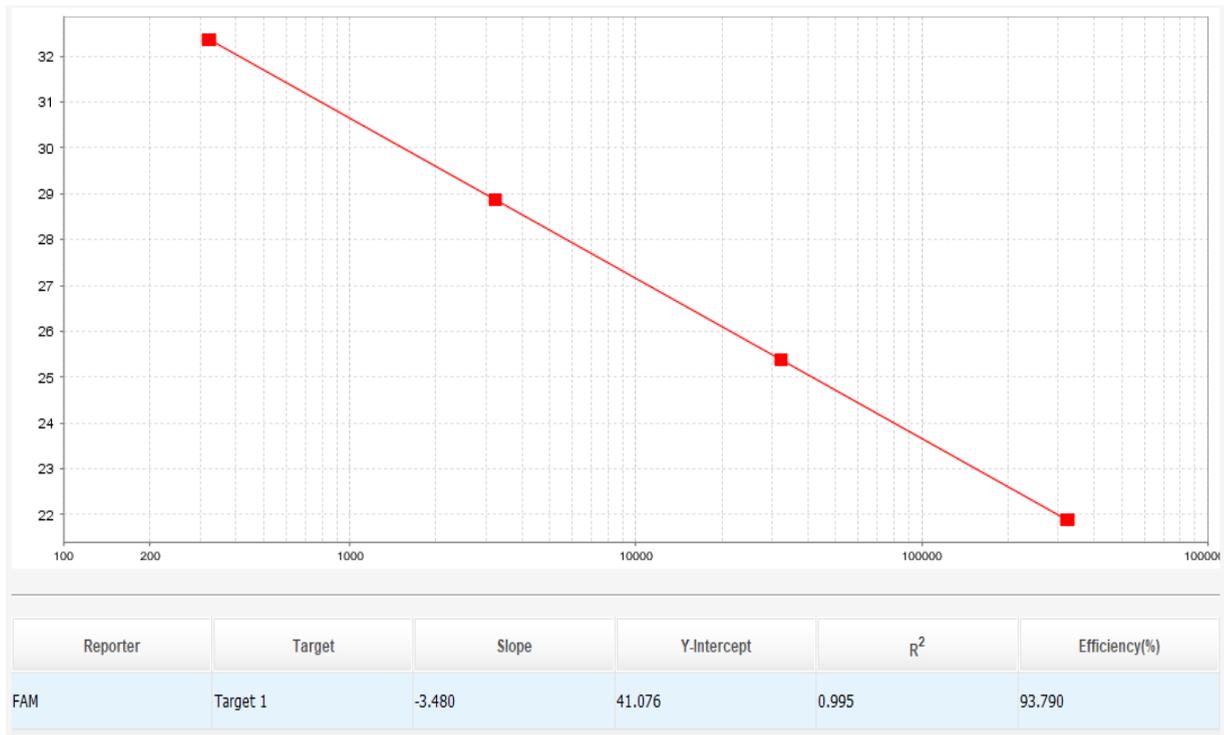
Reagentes	Vol.(μ l)	Concentração final
TaqMan Master Mix 2X	6,25	1 x
P HPV 18 E7 (10 μ M)	0,5	0,4 μ M
P HPV 18 E7S (10 μ M)	0,5	0,4 μ M
Probe HPV 18 (10 μ M)	0,5	0,4 μ M
H ₂ O	2,25	
DNA	2,5	μ g/ml
TOTAL	12,5	

A ciclagem foi de 50°C por dois minutos e 95°C por dez minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por um minuto e 60°C por um minuto. Foi incluído como controle positivo DNA de células HeLa e água RNase e DNase-free como branco da reação. A reação de qPCR foi processada no equipamento QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA), e todas as amostras foram realizadas em duplicata.

5.6.8 Quantificação da carga viral HPV 16 em amostra de plasma

Para a realização de ensaio de PCR em tempo real quantitativo para o HPV 16 foi construída uma curva padrão, utilizando-se DNA extraído de células SiHa, (uma cópia de HPV 16/célula) na concentração 55,6ng/ μ L, gentilmente cedido pelo Dr. José Eduardo Levi, do Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo. Inicialmente 100 μ L do DNA extraído de células SiHa foram adicionados a 300 μ L de plasma negativo. Sabendo-se que 1 célula diplóide possui 6,6 pg de DNA e que a linhagem celular SIHA possui 1 cópia de HPV 16 em um volume final de 400 μ L, uma série de diluições seriadas (1:10) foi realizada para gerar a curva padrão (**Figura 10**).

Figura 10 – Curva-padrão de amplificação para cálculo do número absoluto de moléculas de HPV presentes na amostra testada



Os resultados obtidos foram expressos em cópias por reação, portanto, para convertê-los em cópias/mL de plasma, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Resultado em cópias/mL} = \frac{\text{Cópia}/\mu\text{L} \times \text{Volume de eluição } (\mu\text{L})^{**}}{\text{Volume de amostra extraída (mL)}^{**}}$$

* Resultado da quantificação da amostra fornecido pelo equipamento em cópias / μL

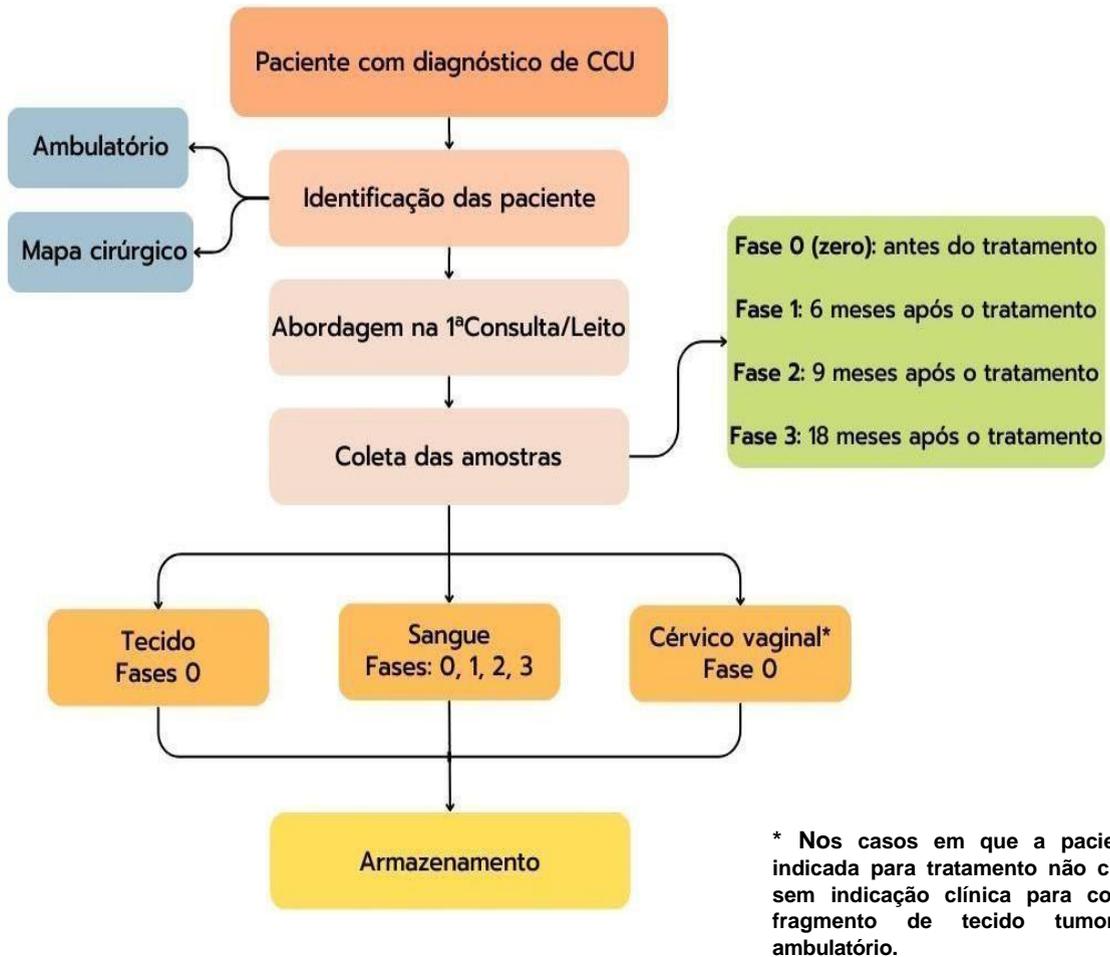
** De acordo com o protocolo do *kit* de extração utilizado

5.6.9 Coleta das amostras de plasma das pacientes em *follow up*

O primeiro contato e a primeira coleta das pacientes foram realizados conforme relatado nos itens 5.6.1 e 5.6.2. No entanto as coletas das amostras, durante o *follow up*, foram feitas de acordo com as visitas ao hospital quer fossem para consulta odontológica, médica, psicológica, serviço social, fisioterapia, além de algumas visitas domiciliares, juntamente com o serviço social da FCECON.

A estratégia metodológica adotada para a seleção das pacientes e para a coleta das amostras pode ser visualizada na **Figura 11**.

Figura 11 – Seleção das pacientes e coleta das amostras



Os desfechos clínicos analisados no estudo foram recidiva/persistência da doença ou óbito. A última consulta aos prontuários das pacientes foi realizada em junho de 2023.

5.7 Análise estatística

Primeiramente, criou-se banco de dados no programa Epi Info versão 7.2.5 para Windows com todas as variáveis relacionadas ao estudo. Realizou-se análise

descritiva e exploratória de todas as variáveis, tendo sido as frequências apresentadas em tabelas ou gráficos.

A presença de positividade do cf-DNA HPV no plasma antes do tratamento para câncer de colo do útero e, durante o tratamento, considerando os períodos deste estudo (T_1 a T_3), foi apresentada por meio de um *Swimmer Plot*, tendo sido elaborado no programa Microsoft Excel e Adobe Illustrator. Essa forma gráfica descreve a trajetória das pacientes ao longo do tempo.

A análise de sobrevida foi realizada considerando o método de Kaplan-Meier, tendo sido realizadas as comparações da sobrevida por fatores pelo teste de *Log-Rank*. O tempo de sobrevida considerou a data do início do tratamento das pacientes e a data de óbito ou a data final de seguimento de cada paciente neste estudo. Para as três pacientes que não realizaram tratamento, considerou-se como data inicial a data de entrada neste estudo. Foi analisado ainda o delta-tempo (Δt) das pacientes que realizaram o tratamento, cuja análise correspondeu ao período decorrido a partir da primeira consulta até a data de início do tratamento das mulheres.

Para verificar a relação entre as características clínicas (estadiamento) e histopatológicas das pacientes com a presença dos marcadores utilizados no seguimento, utilizou-se o teste Qui-Quadrado de Pearson.

As análises foram realizadas prioritariamente no programa estatístico IBM SPSS Statistics versão 21. Em todas as comparações, utilizou-se o nível de 5% de significância para a conclusão dos testes de hipóteses referentes a cada ferramenta estatística utilizada neste estudo (Sobrevida de Kaplan-Meier; Teste de Log-Rank; e Teste Qui-Quadrado de Pearson).

5.8 Aspectos éticos do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas com número de parecer 3.997.504. O protocolo foi desenhado de acordo com os requisitos da Resolução n.º 466/2012 (Anexo A).

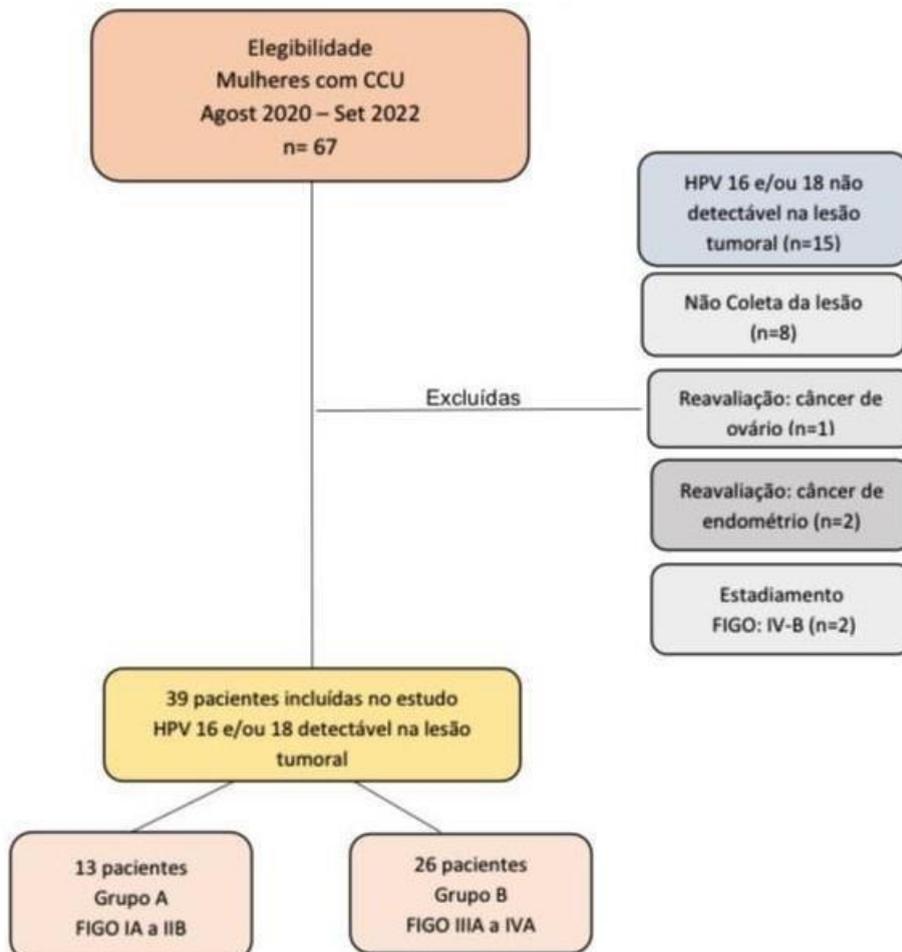
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de período de 31 de agosto de 2020 a 30 de setembro de 2022, foram abordadas 67 mulheres com diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma invasor. Dentre os motivos de exclusão, cita-se a não coleta da lesão tumoral por dois motivos: mudança de data da cirurgia da paciente e limitação clínica para a coleta da amostra.

Somente as pacientes cujas amostras de lesão tumoral (tecido ou células cérvico vaginais) foram detectáveis para cf-DNA HPV 16 e/ou 18 seguiram para análise do plasma e foram submetidas ao *follow up*. O fluxograma das pacientes elegíveis para o estudo é demonstrado na **Figura 12**.

Os demais resultados obtidos e a discussão da pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico (**Apêndice C**).

Figura 12 – Mulheres elegíveis para o estudo



7 CONCLUSÃO

- ✓ A detecção de cf-DNA HPV em pacientes com câncer de colo do útero, após tratamento, mostra uma tendência ao desenvolvimento de recidiva da doença.
- ✓ O cf-DNA HPV no plasma na fase zero (antes do tratamento) foi detectado em 53,8% das pacientes diagnosticadas com câncer de colo do útero.
- ✓ Foi possível detectar o cf-DNA HPV no plasma seis meses antes do diagnóstico clínico da doença (recidiva/ persistência).
- ✓ Foi possível observar uma tendência segundo a qual mulheres que apresentaram o cf-DNA HPV no plasma apresentaram menor sobrevida.

8 DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Devido às limitações causadas pela pandemia de SARS-CoV-2, algumas dificuldades foram enfrentadas durante o estudo. A primeira delas foi em se obter o número inicial de 30 pacientes por grupo, conforme previsto preliminarmente, pois as mulheres com câncer de colo do útero não procuraram e/ou não conseguiram chegar à FCECON. Em virtude dos entraves vivenciados no período da covid-19, também não foi possível manter a continuidade nas coletas das amostras biológicas nas etapas previstas. Dessa forma, a análise completa das quatro fases ficou comprometida, portanto, com o número amostral obtido, não foi possível extrapolar os resultados.

Outra limitação foi quanto à consulta de informações e à interpretação dos prontuários das pacientes para observar presença de recidiva/persistência da doença. Ademais, o tempo estudado variou de seis a 18 meses, o que pode ter comprometido a análise de sobrevida.

9 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, continuar-se-á o *follow up* das pacientes participantes da pesquisa a fim de se obterem mais informações sobre o perfil clínico associado à presença ou à ausência do cf-DNA HPV no plasma.

Há também a perspectiva de, em havendo a ampliação de estudos de aplicação da detecção do cf-DNA HPV, inserir essa prática na rotina do seguimento de pacientes na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. maio de 2021 [citado 27 de dezembro de 2023];71(3):209–49. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>
2. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Wild CP WESB, organizador. Vol. 199, Cancer Control. IARC; 2020. 477 p.
3. INCA. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. [Internet]. 2022. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
4. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 6 de fevereiro de 2003 [citado 27 de dezembro de 2023];348(6):518–27. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12571259/>
5. Schiffman M. Cervical cancer screening: epidemiology as the necessary but not sufficient basis of public health practice. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 1º de maio de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];98:3. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5347462/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3547462/)
6. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 26 de dezembro de 2023];47:2–13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28964706/>
7. Cubie HA. Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology* [Internet]. outubro de 2013 [citado 26 de dezembro de 2023];445(1–2):21–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23932731/>
8. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002 [citado 27 de dezembro de 2023];2(5):342–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12044010/>
9. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. maio de 2006 [citado 26 de dezembro de 2023];110(5):525–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16597322/>
10. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* [Internet]. 8 de setembro de 2007 [citado 27 de dezembro de 2023];370(9590):890–907. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17826171/>
11. Gu Y, Wan C, Qiu J, Cui Y, Jiang T, Zhuang Z. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224001>
12. Hernádi Z, Gazdag L, Szoke K, Sápy T, Krasznai ZT, Kónya J. Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 2006;125(1).

13. De Marco L, Gillio-Tos A, Bonello L, Ghisetti V, Ronco G, Merletti F. Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 2007;38(1).
14. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*. 1º de março de 2019;17:100087.
15. Elit L, Kennedy EB, Fyles A, Metser U. Follow-up for cervical cancer: A program in evidence-based care systematic review and clinical practice guideline update. *Current Oncology* [Internet]. 1º de abril de 2016 [citado 30 de abril de 2023];23(2):109–18. Disponível em: </pmc/articles/PMC4835009/>
16. Elit L, Fyles AW, Devries MC, Oliver TK, Fung-Kee-Fung M. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. *Gynecol Oncol* [Internet]. setembro de 2009 [citado 21 de maio de 2023];114(3):528–35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19560188/>
17. Moreira ASL, Cunha TM, Esteves S. Cervical cancer recurrence – can we predict the type of recurrence? *Diagnostic and Interventional Radiology* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 21 de maio de 2023];26(5):403–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32815522/>
18. Mayadev JS, Ke G, Mahantshetty U, Pereira MD, Tarnawski R, Toita T. Global challenges of radiotherapy for the treatment of locally advanced cervical cancer. Vol. 32, *International Journal of Gynecological Cancer*. 2022.
19. Hull R, Mbele M, Makhafola T, Hicks C, Wang SM, Reis RM, et al. Cervical cancer in low and middle-income countries. *Oncol Lett* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 28 de dezembro de 2023];20(3):2058. Disponível em: </pmc/articles/PMC7400218/>
20. Garnelo L, Sousa ABL, Da Silva CDO. Health regionalization in Amazonas: Progress and challenges. *Ciencia e Saude Coletiva*. 2017;22(4).
21. Viana JN, Moysés RPC, Espir TT, De Sousa GA, Barcellos JFM, Da Graça Pereira Alves M. Social determinants of health and secondary prevention of cervical cancer in the State of Amazonas, Brazil. *Medicina (Brazil)*. 2019;52(2).
22. Sabeena S, Kuriakose S, Damodaran B, Ravishankar N, Arunkumar G. Human papillomavirus (HPV) DNA detection in uterine cervix cancer after radiation indicating recurrence: A systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 2020;31(2). Disponível em: <https://ejgo.org>
23. CLARKE GH. The Charming of Warts. *Journal of Investigative Dermatology*. 1º de julho de 1965;45(1):15–21.
24. Ciuffo G. Innesto positivo con filtrado di verruca volgare. *GitalMalVenPelle*. 1907;48:12–7.
25. Strauss MJ, Shaw EW, Melnick JL. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1949 [citado 27 de dezembro de 2023];72(1):46–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15403582/>
26. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*. fevereiro de 1976;36(2 pt 2):794.

27. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* [Internet]. 21 de agosto de 2006 [citado 28 de dezembro de 2023];24 Suppl 3(SUPPL. 3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949995/>
28. Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* [Internet]. 2005 [citado 27 de dezembro de 2023];32 Suppl 1(SUPPL.):43–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753011/>
29. Villa LL, Denny L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 2006 [citado 27 de dezembro de 2023];94 Suppl 1(SUPPL. 1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29644640/>
30. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 20 de junho de 2004 [citado 26 de dezembro de 2023];324(1):17–27. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15183049/>
31. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol* [Internet]. 1º de março de 2015 [citado 26 de dezembro de 2023];25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752814/>
32. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, De Sanjosé S, Franceschi S, et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de novembro de 2012 [citado 26 de dezembro de 2023];131(10):2349–59. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22323075/>
33. Demarco M, Hyun N, Carter-Pokras O, Raine-Bennett TR, Cheung L, Chen X, et al. A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine* [Internet]. 1º de maio de 2020 [citado 26 de dezembro de 2023];22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32510043/>
34. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009 [citado 26 de dezembro de 2023];10(4):321–2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19350698/>
35. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, De Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 1º de dezembro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27905473/>
36. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* [Internet]. 1º de fevereiro de 2015 [citado 26 de dezembro de 2023];476:341–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577151/>
37. Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JPJ. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* [Internet]. 2010 [citado 26 de dezembro de 2023];7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20089191/>
38. Banks L, Pim D, Thomas M. Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. dezembro de 2012 [citado 26 de dezembro de 2023];12(12):877–86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23175122/>

39. Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother* [Internet]. 2012 [citado 27 de dezembro de 2023];18(6):807–15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23117294/>
40. Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2010 [citado 27 de dezembro de 2023];5(1):19. Disponível em: </pmc/articles/PMC3161350/>
41. Murakami I, Egawa N, Griffin H, Yin W, Kranjec C, Nakahara T, et al. Roles for E1-independent replication and E6-mediated p53 degradation during low-risk and high-risk human papillomavirus genome maintenance. *PLoS Pathog* [Internet]. 1º de maio de 2019 [citado 27 de dezembro de 2023];15(5). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31083694/>
42. Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res* [Internet]. 2011 [citado 26 de dezembro de 2023];10(1):186–96. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21341210/>
43. Rocha DAP, Barbosa Filho RAA, De Queiroz FA, Dos Santos CMB. High Prevalence and Genotypic Diversity of the Human Papillomavirus in Amazonian Women, Brazil. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2013 [citado 27 de dezembro de 2023];2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3755431/>
44. Torres KL, Mariño JM, Pires Rocha DA, de Mello MB, de Melo Farah HH, dos Santos Reis R, et al. Self-sampling coupled to the detection of HPV 16 and 18 E6 protein: A promising option for detection of cervical malignancies in remote areas. *PLoS One* [Internet]. 1º de julho de 2018 [citado 27 de dezembro de 2023];13(7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30036381/>
45. Fantin C, Freitas JB, Teles HFM, Oliveira BAS, Brito D V. High prevalence of HPV 18 and multiple infections with oncogenic HPV genotypes in women at risk of cervical cancer examined in Manaus, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [Internet]. 29 de maio de 2023 [citado 26 de dezembro de 2023];56:e12720. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/3n6YJHMxtBQmMbQ7g3kLsGz/>
46. IARC IA for R on C. Número estimado de novos casos em 2020. 2020;
47. Soerjomataram I, Bardot A, Aitken J, Piñeros M, Znaor A, Steliarova-Foucher E, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on population-based cancer registry. *Int J Cancer* [Internet]. 1º de janeiro de 2022 [citado 27 de dezembro de 2023];150(2):273. Disponível em: </pmc/articles/PMC8652711/>
48. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de agosto de 2021 [citado 26 de dezembro de 2023];149(4):778–89. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33818764/>
49. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention [Internet]. [citado 27 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030824>

50. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol [Internet]*. 2002 [citado 26 de dezembro de 2023];55(4):244–65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11919208/>
51. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2018;143:22–36.
52. Powell NG, Hibbitts SJ, Boyde AM, Newcombe RG, Tristram AJ, Fiander AN. The risk of cervical cancer associated with specific types of human papillomavirus: a case-control study in a UK population. *Int J Cancer [Internet]*. 1º de abril de 2011 [citado 27 de dezembro de 2023];128(7):1676–82. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20503274/>
53. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*. 1997;71.
54. Yang X, Jin G, Nakao Y, Rahimtula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarette smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1996;65(3).
55. Rajkumar T, Cuzick J, Appleby P, Barnabas R, Beral V, Berrington De González A, et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;119(5).
56. Autier P, Coibion M, Huet F, Grivegne AR. Transformation zone location and intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Br J Cancer*. 1996;74(3).
57. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: Putative roles for inflammation and oxidative stress. Vol. 6, *Future Virology*. 2011.
58. Adam E, Berkova Z, Daxnerova Z, Icenogle J, Reeves WC, Kaufman RH. Papillomavirus detection: Demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(2).
59. Brisson J, Morin C, Fortier M, Roy M, Bouchard C, Leclerc J, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: Differences between low- and high-grade lesions. *Am J Epidemiol*. 1994;140(8).
60. Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research [Internet]*. 2017;179:168–82. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2016.07.004>
61. Łaniewski P, İlhan ZE, Herbst-Kralovetz MM. The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. *Nature Reviews Urology*. 2020.
62. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;210(11).
63. Shannon B, Yi TJ, Perusini S, Gajer P, Ma B, Humphrys MS, et al. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunol*. 2017;10(5).

64. Xu J, Peng JJ, Yang W, Fu K, Zhang Y. Vaginal microbiomes and ovarian cancer: a review. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3).
65. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, Iossa A, Perissi E, Castronovo G, et al. Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci Rep*. 2017;7(1).
66. Sharifian K, Shoja Z, Jalilvand S. The interplay between human papillomavirus and vaginal microbiota in cervical cancer development. Vol. 20, *Virology Journal*. 2023.
67. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer* [Internet]. 1º de julho de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];123(13):2404–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28464289/>
68. Shanmugasundaram S, You J. Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses* [Internet]. 18 de fevereiro de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];9(8). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28820433/>
69. Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* [Internet]. janeiro de 2006 [citado 27 de dezembro de 2023];208(2):152–64. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16362994/>
70. WHO histological classification of tumours of the uterine cervix [Internet]. [citado 27 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlasclassifwho.php>
71. Nogueira-Rodrigues A, Ferreira CG, Bergmann A, De Aguiar SS, Thuler LCS. Comparison of adenocarcinoma (ACA) and squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix in a sub-optimally screened cohort: a population-based epidemiologic study of 51,842 women in Brazil. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1º de novembro de 2014 [citado 27 de dezembro de 2023];135(2):292–6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25130677/>
72. Holl K, Nowakowski AM, Powell N, McCluggage WG, Pirog EC, Collas De Souza S, et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de dezembro de 2015 [citado 26 de dezembro de 2023];137(12):2858–68. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096203/>
73. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA*. 18 de agosto de 1989;262(7):931–4.
74. The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: report of the 1991 Bethesda workshop. *Acta Cytol*. 1992;36(3):273–6.
75. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* [Internet]. 24 de abril de 2002 [citado 27 de dezembro de 2023];287(16):2114–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11966386/>
76. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 1º de maio de 2015 [citado 27 de dezembro de 2023];123(5):271–81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931431/>

77. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, et al. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. *Vaccine* [Internet]. 11 de novembro de 2012 [citado 27 de dezembro de 2023];30(0 5):F24. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3700362/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22700362/)
78. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* [Internet]. 12 de janeiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];393(10167):169–82. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638582/>
79. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics* [Internet]. agosto de 2009 [citado 26 de dezembro de 2023];12(5–6):281. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2835381/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/192835381/)
80. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, Xi LF, Lee SK, O’Reilly SF, et al. Prevalence and risk factors for oncogenic HPV infections in high-risk mid-adult women. *Sex Transm Dis* [Internet]. novembro de 2012 [citado 27 de dezembro de 2023];39(11):848. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3476060/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22476060/)
81. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol* [Internet]. 3 de julho de 2020 [citado 27 de dezembro de 2023];40(5):602–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500479/>
82. Stanley MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 2012 [citado 27 de dezembro de 2023];25(2):215. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3346303/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22346303/)
83. Zhou C, Tuong ZK, Frazer IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol* [Internet]. 2 de agosto de 2019 [citado 27 de dezembro de 2023];9. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6688195/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32688195/)
84. Ferreira AR, Ramalho AC, Marques M, Ribeiro D. The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1º de março de 2020 [citado 28 de dezembro de 2023];12(3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32164347/>
85. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de janeiro de 2018 [citado 27 de dezembro de 2023];142(2):224–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28865151/>
86. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 26 de dezembro de 2023];21(9):501–21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32424334/>
87. Mehta AM, Mooij M, Branković I, Ouburg S, Morré SA, Jordanova ES. Cervical Carcinogenesis and Immune Response Gene Polymorphisms: A Review. *J Immunol Res* [Internet]. 2017 [citado 28 de dezembro de 2023];2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5322437/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3522437/)
88. International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO). Human Papillomaviruses [Internet]. Vol. 90, Human papillomaviruses. 2007 [citado 26 de dezembro de 2023]. 670 p. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/IARC-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Human-Papillomaviruses-2007>

89. Desai KT, Befano B, Xue Z, Kelly H, Campos NG, Egemen D, et al. The development of “automated visual evaluation” for cervical cancer screening: The promise and challenges in adapting deep-learning for clinical testing. *Int J Cancer*. 2022;150(5).
90. Hou X, Shen G, Zhou L, Li Y, Wang T, Ma X. Artificial Intelligence in Cervical Cancer Screening and Diagnosis. *Front Oncol*. 2022;12(March):1–13.
91. Ito Y, Miyoshi A, Ueda Y, Tanaka Y, Nakae R, Morimoto A, et al. An artificial intelligence-assisted diagnostic system improves the accuracy of image diagnosis of uterine cervical lesions. *Mol Clin Oncol*. 2022;16(2).
92. Allahqoli L, Laganà AS, Mazidimoradi A, Salehiniya H, Günther V, Chiantera V, et al. Diagnosis of Cervical Cancer and Pre-Cancerous Lesions by Artificial Intelligence: A Systematic Review. Vol. 12, *Diagnostics*. 2022. p. 1–32.
93. Hu L, Horning MP, Banik D, Ajenifuja OK, Adepiti CA, Yeates K, et al. Deep learning-based image evaluation for cervical precancer screening with a smartphone targeting low resource settings - Engineering approach. Em: *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*. 2020.
94. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* [Internet]. 21 de agosto de 2006 [citado 27 de dezembro de 2023];24 Suppl 3(SUPPL. 3). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16950019/>
95. Instituto Nacional de Câncer. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero [Internet]. 2016 [citado 26 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diretrizes-brasileiras-para-o-rastreamento-do-cancer-do-colo-do-utero>
96. Cavalcanti SMB, Carestiato FN. Infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. *DST j bras doenças sex transm* [Internet]. 2006 [citado 26 de dezembro de 2023];73–9. Disponível em: <https://www.bjstd.org/revista/article/view/619/546>
97. McGoogan E, Colgan TJ, Ramzy I, Cochand-Priollet B, Davey DD, Grohs HK, et al. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. *International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and Tutorial. Acta Cytol* [Internet]. 1998 [citado 27 de dezembro de 2023];42(1):25–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9479321/>
98. Siebers AG, Klinkhamer PJJM, Grefte JMM, Massuger LFAG, Vedder JEM, Beijers-Broos A, et al. Comparison of liquid-based cytology with conventional cytology for detection of cervical cancer precursors: a randomized controlled trial. *JAMA* [Internet]. 2009 [citado 27 de dezembro de 2023];302(16):1757–64. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19861667/>
99. Nishio H, Iwata T, Nomura H, Morisada T, Takeshima N, Takano H, et al. Liquid-based cytology versus conventional cytology for detection of uterine cervical lesions: a prospective observational study. *Jpn J Clin Oncol* [Internet]. 1º de junho de 2018 [citado 27 de dezembro de 2023];48(6):522–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29668969/>
100. Schmitt FC, Longatto-Filho A. Gynecological cytology: Too old to be a pop star but too young to die. *Diagn Cytopathol*. outubro de 2007;35(10):672–3.

101. Filho AL, Schmitt FC. Cytology education in the 21st century: living in the past or crossing the Rubicon? *Acta Cytol* [Internet]. 2010 [citado 26 de dezembro de 2023];54(4):654–6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20715674/>
102. Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual [Internet]. [citado 27 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/colpo.php>
103. Souza NST de, Melo VH do, Castro LPF de. diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* [Internet]. julho de 2001 [citado 27 de dezembro de 2023];23(6):355–64. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbgo/a/bKMYvXqYj8nK3FsJ7XmkcPF/>
104. Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2011 [citado 27 de dezembro de 2023];25(5):605–15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21636328/>
105. Mitildzans A, Arechvo A, Rezeberga D, Isajevs S. Expression of p63, p53 and Ki-67 in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Turk Patoloji Derg* [Internet]. 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];33(1):9–16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28044307/>
106. Walboomers JM, Jacobs M V, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. setembro de 1999;189(1):12–9.
107. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1º de agosto de 2003 [citado 26 de dezembro de 2023];127(8):940–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12873165/>
108. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Palma PD, Del Mistro A, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* [Internet]. março de 2010 [citado 27 de dezembro de 2023];11(3):249–57. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20089449/>
109. Bains I, Choi YH, Soldan K, Jit M. Clinical impact and cost-effectiveness of primary cytology versus human papillomavirus testing for cervical cancer screening in England. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 1º de maio de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];29(4):669–75. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018938/>
110. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* [Internet]. 1º de dezembro de 2004 [citado 28 de dezembro de 2023];122(1):87–93. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15488625/>
111. Jeantet D, Schwarzmann F, Tromp J, Melchers WJG, van der Wurff AAM, Oosterlaken T, et al. NucliSENS EasyQ HPV v1 test - Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *J Clin Virol* [Internet]. julho de 2009 [citado 28 de dezembro de 2023];45 Suppl 1(SUPPL. 1). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19651366/>
112. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4).

113. Hall Sedlak R, Jerome KR. The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2014 [citado 26 de dezembro de 2023];14(4):501–7. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737159.2014.910456>
114. Vynck M, Trypsteen W, Thas O, Vandekerckhove L, De Spiegelaere W. The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology. *Mol Diagn Ther* [Internet]. 1º de outubro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];20(5):437–47. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27351921/>
115. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* [Internet]. 1º de janeiro de 2015 [citado 28 de dezembro de 2023];61(1):79–88. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25338683/>
116. Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1º de junho de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];55(6):1621–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28298452/>
117. Adcock R, Nedjai B, Lorincz AT, Scibior-Bentkowska D, Banwait R, Torrez-Martinez N, et al. DNA methylation testing with S5 for triage of high-risk HPV positive women. *Int J Cancer*. 2022;151(7).
118. Yang L, Tao H, Lin B, He X, Chen Y, Fan X. Utilization of PAX1 methylation test for cervical cancer screening of non-HPV16/18 high-risk HPV infection in women. *Future Oncol*. 2023;19(28).
119. Salta S, Lobo J, Magalhães B, Henrique R, Jerónimo C. DNA methylation as a triage marker for colposcopy referral in HPV-based cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1).
120. Brotherton JML, Bloem PN. Population-based HPV vaccination programmes are safe and effective: 2017 update and the impetus for achieving better global coverage. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 1º de fevereiro de 2018 [citado 26 de dezembro de 2023];47:42–58. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28986092/>
121. Lu B, Kumar A, Castellsagué X, Giuliano AR. Efficacy and safety of prophylactic vaccines against cervical HPV infection and diseases among women: a systematic review & meta-analysis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 12 de janeiro de 2011 [citado 28 de dezembro de 2023];11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21226933/>
122. Chen W, Zhao Y, Xie X, Liu J, Li J, Zhao C, et al. Safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in a Phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial among Chinese women during 90 months of follow-up. *Vaccine* [Internet]. 4 de fevereiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];37(6):889–97. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638797/>
123. Dhar JP, Essenmacher L, Dhar R, Magee A, Ager J, Sokol RJ. The safety and immunogenicity of Quadrivalent HPV (qHPV) vaccine in systemic lupus erythematosus. *Vaccine* [Internet]. 9 de maio de 2017 [citado 26 de dezembro de 2023];35(20):2642–6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28404357/>

124. Braverman PK. HPV Vaccine in Adolescents. *Pediatr Ann* [Internet]. 1º de fevereiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];48(2):e71–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30747983/>
125. Castle PE, Xie X, Xue X, Poitras NE, Lorey TS, Kinney WK, et al. Impact of human papillomavirus vaccination on the clinical meaning of cervical screening results. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];118:44–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30316878/>
126. Simms KT, Steinberg J, Caruana M, Smith MA, Lew J Bin, Soerjomataram I, et al. Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020-99: a modelling study. *Lancet Oncol* [Internet]. 1º de março de 2019 [citado 27 de dezembro de 2023];20(3):394–407. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30795950/>
127. Hall MT, Simms KT, Lew J Bin, Smith MA, Brotherton JM, Saviile M, et al. The projected timeframe until cervical cancer elimination in Australia: a modelling study. *Lancet Public Health* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];4(1):e19–27. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S246826671830183X/fulltext>
128. Canfell K. Towards the global elimination of cervical cancer. *Papillomavirus Res* [Internet]. 1º de dezembro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31176807/>
129. INCA IN de C. Vacina contra HPV. 2022; Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>
130. MS M da SaúdeS de V em S e Ambiente. Boletim Epidemiológico. Boletim Epidemiológico. 2023;54 (2).
131. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman WT. History of the FIGO cancer staging system. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2008;101(2).
132. FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and corpus uteri. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 1º de maio de 2014 [citado 28 de dezembro de 2023];125(2):97–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24630859/>
133. Kosary CL. FIGO stage, histology, histologic grade, age and race as prognostic factors in determining survival for cancers of the female gynecological system: an analysis of 1973-87 SEER cases of cancers of the endometrium, cervix, ovary, vulva, and vagina. *Semin Surg Oncol* [Internet]. 1994 [citado 27 de dezembro de 2023];10(1):31–46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8115784/>
134. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* [Internet]. junho de 2010 [citado 26 de dezembro de 2023];17(6):1471–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20180029/>
135. Wright JD, Nathavithrana R, Lewin SN, Sun X, Deutsch I, Burke WM, et al. Fertility-conserving surgery for young women with stage IA1 cervical cancer: safety and access. *Obstetrics and gynecology* [Internet]. março de 2010 [citado 27 de dezembro de 2023];115(3):585–90. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20177290/>

136. Yoneda JY, Braganca JF, Sarian LO, Borba PP, Conceição JCJ, Zeferino LC. Surgical treatment of microinvasive cervical cancer: analysis of pathologic features with implications on radicality. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 7 de maio de 2015 [citado 27 de dezembro de 2023];25(4):694–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25742569/>
137. Alberton DL, Salcedo MP, Zen RP, Ferreira CF, Schmeler K, Pessini SA. Conservative Treatment of Stage IA1 Cervical Carcinoma Without Lymphovascular Space Invasion: A 20-year Retrospective Study in Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2022;45(4).
138. Fagotti A, Gagliardi ML, Moruzzi C, Carone V, Scambia G, Fanfani F. Excisional cone as fertility-sparing treatment in early-stage cervical cancer. *Fertil Steril* [Internet]. 1º de março de 2011 [citado 26 de dezembro de 2023];95(3):1109–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21122837/>
139. Guimarães YM, Godoy LR, Longatto-Filho A, Dos Reis R. Management of Early-Stage Cervical Cancer: A Literature Review. Vol. 14, *Cancers*. 2022.
140. Lee SI, Atri M. 2018 FIGO Staging System for Uterine Cervical Cancer: Enter Cross-sectional Imaging. *Radiology* [Internet]. 2019 [citado 28 de dezembro de 2023];292(1):15–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31135294/>
141. Melamed A, Margul DJ, Chen L, Keating NL, del Carmen MG, Yang J, et al. Survival after Minimally Invasive Radical Hysterectomy for Early-Stage Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 15 de novembro de 2018 [citado 27 de dezembro de 2023];379(20):1905–14. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1804923>
142. Guo C, Tang X, Meng Y, Zhang Y, Zhang X, Guo J, et al. Effect of the surgical approach on survival outcomes in patients undergoing radical hysterectomy for cervical cancer: A real-world multicenter study of a large Chinese cohort from 2006 to 2017. *Cancer Med* [Internet]. 1º de agosto de 2020 [citado 26 de dezembro de 2023];9(16):5908. Disponível em: </pmc/articles/PMC7433827/>
143. Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1999 [citado 27 de dezembro de 2023];73(2):177–83. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10329031/>
144. Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* [Internet]. 2000 [citado 27 de dezembro de 2023];18(8):1606–13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10764420/>
145. Liu H, Ma X, Sun C, Wu M, Xu Z, Zhou S, et al. Concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. 2022.
146. Vale C, Tierney JF, Stewart LA, Brady M, Dinshaw K, Jakobsen A, et al. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 de

- dezembro de 2008 [citado 27 de dezembro de 2023];26(35):5802–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19001332/>
147. Maneo A, Landoni F, Cormio G, Colombo A, Mangioni C. Radical hysterectomy for recurrent or persistent cervical cancer following radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 1999 [citado 27 de dezembro de 2023];9(4):295–301. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11240782/>
 148. Devine C, Viswanathan C, Faria S, Marcal L, Sagebiel TL. Imaging and Staging of Cervical Cancer. *Semin Ultrasound CT MR* [Internet]. 1º de agosto de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];40(4):280–6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375168/>
 149. Hong JH, Tsai CS, Lai CH, Chang TC, Wang CC, Chou HH, et al. Recurrent squamous cell carcinoma of cervix after definitive radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 1º de setembro de 2004 [citado 26 de dezembro de 2023];60(1):249–57. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15337563/>
 150. Elit L, Kennedy EB, Fyles A, Metser U. Follow-up for cervical cancer: a Program in Evidence-Based Care systematic review and clinical practice guideline update. *Current Oncology* [Internet]. 1º de abril de 2016 [citado 26 de dezembro de 2023];23(2):109. Disponível em: </pmc/articles/PMC4835009/>
 151. Park KJ, Braschi-Amirfarzan M, DiPiro PJ, Giardino AA, Jagannathan JP, Howard SA, et al. Multimodality imaging of locally recurrent and metastatic cervical cancer: emphasis on histology, prognosis, and management. *Abdom Radiol (NY)* [Internet]. 1º de dezembro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];41(12):2496–508. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27357415/>
 152. Fulcher AS, O’Sullivan SG, Segreti EM, Kavanagh BD. Recurrent cervical carcinoma: typical and atypical manifestations. *Radiographics* [Internet]. 1999 [citado 30 de abril de 2023];19 Spec No(SPEC.ISS.). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10517448/>
 153. Engin G. Cervical cancer: MR imaging findings before, during, and after radiation therapy. *Eur Radiol* [Internet]. fevereiro de 2006 [citado 30 de abril de 2023];16(2):313–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16425027/>
 154. Salani R, Khanna N, Frimer M, Bristow RE, Chen L may. An update on post-treatment surveillance and diagnosis of recurrence in women with gynecologic malignancies: Society of Gynecologic Oncology (SGO) recommendations. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1º de julho de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];146(1):3–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28372871/>
 155. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 1º de outubro de 2018 [citado 26 de dezembro de 2023];143 Suppl 2:22–36. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30306584/>
 156. Hillesheim I, Limone GA, Klimann L, Monego H, Appel M, De Souza A, et al. Cervical cancer posttreatment follow-up: Critical analysis. *International Journal of Gynecological Cancer* [Internet]. 1º de outubro de 2017 [citado 30 de abril de 2023];27(8):1747–52. Disponível em: <https://ijgc.bmj.com/content/27/8/1747>
 157. de Foucher T, Bendifallah S, Ouldamer L, Bricou A, Lavoue V, Varinot J, et al. Patterns of recurrence and prognosis in locally advanced FIGO stage IB2 to IIB cervical cancer:

- Retrospective multicentre study from the FRANCOGYN group. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 1º de abril de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];45(4):659–65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30685326/>
158. Schieda N, Malone SC, Al Dandan O, Ramchandani P, Siegelman ES. Multi-modality organ-based approach to expected imaging findings, complications and recurrent tumour in the genitourinary tract after radiotherapy. *Insights Imaging* [Internet]. fevereiro de 2014 [citado 27 de dezembro de 2023];5(1):25. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3948910/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/248910/)
 159. Duyn A, VanEijkeren M, Kenter G, Zwinderman K, Ansink A. Recurrent cervical cancer: detection and prognosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. janeiro de 2002 [citado 26 de dezembro de 2023];81(4):351–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952468/>
 160. Yu MC, Austin RM, Lin J, Beck T, Beriwal S, Comerci JT, et al. The Role of High-Risk Human Papilloma Virus Testing in the Surveillance of Cervical Cancer After Treatment. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 1º de novembro de 2015 [citado 27 de dezembro de 2023];139(11):1437–40. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5858/arpa.2014-0534-OA>
 161. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther* [Internet]. 25 de outubro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];9:6549–59. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27822059/>
 162. Donaldson J, Park BH. Circulating Tumor DNA: Measurement and Clinical Utility. *Annu Rev Med* [Internet]. 29 de janeiro de 2018 [citado 26 de dezembro de 2023];69:223–34. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28846488/>
 163. Houssami N. Overdiagnosis of breast cancer in population screening: does it make breast screening worthless? *Cancer Biol Med* [Internet]. 1º de março de 2017 [citado 31 de maio de 2023];14(1):1. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5365181/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/281811/)
 164. Bellairs JA, Hasina R, Agrawal N. Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 1º de setembro de 2017 [citado 26 de dezembro de 2023];36(3):515–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28801876/>
 165. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. agosto de 2013 [citado 26 de dezembro de 2023];10(8):472–84. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23836314/>
 166. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* [Internet]. junho de 2011 [citado 27 de dezembro de 2023];11(6):426–37. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21562580/>
 167. Lipinski KA, Barber LJ, Davies MN, Ashenden M, Sottoriva A, Gerlinger M. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer* [Internet]. 1º de janeiro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];2(1):49–63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26949746/>
 168. Bennett CW, Berchem G, Kim YJ, El-Khoury V. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [citado 26 de dezembro de 2023];7(43):71013–35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27589834/>

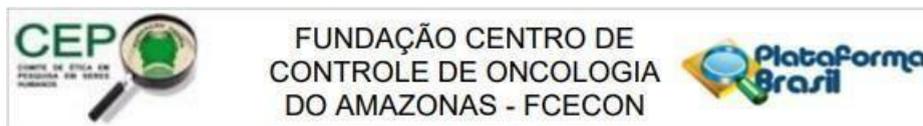
169. Rapisuwon S, Vietsch EE, Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];14:211. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4913179/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252003/)
170. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 1º de setembro de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];14(9):531–48. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28252003/>
171. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology* 2022 15:1 [Internet]. 12 de setembro de 2022 [citado 27 de dezembro de 2023];15(1):1–14. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-022-01351-y>
172. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine*. novembro de 2018;379(18):1754–65.
173. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* [Internet]. 1º de fevereiro de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];20(2):71–88. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30410101/>
174. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review. *Journal of Clinical Oncology*. 1º de junho de 2018;36(16):1631–41.
175. Wong BCK, Lo YMD. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. novembro de 2003 [citado 27 de dezembro de 2023];3(6):785–97. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14628906/>
176. Sharon E, Shi H, Kharbanda S, Koh W, Martin LR, Khush KK, et al. Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 1º de agosto de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];13(8):e1005629. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771616/>
177. Burnham P, Khush K, De Vlaminc I. Myriad applications of circulating cell-free DNA in precision organ transplant monitoring. *Ann Am Thorac Soc* [Internet]. 1º de setembro de 2017 [citado 26 de dezembro de 2023];14(Suppl 3):S237–41. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5711344/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416571/)
178. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, et al. Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma. *PLoS One* [Internet]. 3 de março de 2014 [citado 26 de dezembro de 2023];9(3):e87838. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087838>
179. Cervena K, Vodicka P, Vymetalkova V. Diagnostic and prognostic impact of cell-free DNA in human cancers: Systematic review. *Mutat Res Rev Mutat Res* [Internet]. 1º de julho de 2019 [citado 26 de dezembro de 2023];781:100–29. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31416571/>
180. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. março de 1977;37(3):646–50.

181. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* [Internet]. 1989 [citado 27 de dezembro de 2023];46(5):318–22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2779946/>
182. Dennis Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2001 [citado 26 de dezembro de 2023];945:1–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11708462/>
183. Chan KCA, Lo YMD. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br J Cancer* [Internet]. 3 de março de 2007 [citado 26 de dezembro de 2023];96(5):681. Disponível em: </pmc/articles/PMC2360081/>
184. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* [Internet]. julho de 2005 [citado 26 de dezembro de 2023];49(1):1–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15949585/>
185. Su YH, Wang M, Brenner DE, Norton PA, Block TM. Detection of Mutated K-ras DNA in Urine, Plasma, and Serum of Patients with Colorectal Carcinoma or Adenomatous Polyps. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2008 [citado 27 de dezembro de 2023];1137:197. Disponível em: </pmc/articles/PMC2587049/>
186. Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene* [Internet]. 15 de setembro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];590(1):142–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27317895/>
187. Marzese DM, Hirose H, Hoon DSB. Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2013 [citado 27 de dezembro de 2023];13(8):827–44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24127721/>
188. Esposito A, Criscitiello C, Trapani D, Curigliano G. The Emerging Role of “Liquid Biopsies,” Circulating Tumor Cells, and Circulating Cell-Free Tumor DNA in Lung Cancer Diagnosis and Identification of Resistance Mutations. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 1º de janeiro de 2017 [citado 26 de dezembro de 2023];19(1):1–1. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/28110461>
189. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* [Internet]. 16 de agosto de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];9(403). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814544/>
190. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta* [Internet]. 23 de outubro de 2015 [citado 26 de dezembro de 2023];450:243–53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26341895/>
191. Ungerer V, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S. Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2 de outubro de 2020 [citado 27 de dezembro de 2023];57(7):484–507. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32393081/>
192. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* [Internet]. 1º de outubro de

- 2016 [citado 18 de maio de 2023];14(10):898–908. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27422709/>
193. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DSB. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 [citado 27 de dezembro de 2023];1075:299–307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17108224/>
194. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri C El, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer* [Internet]. novembro de 2013 [citado 27 de dezembro de 2023];82(2):373–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24007628/>
195. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer* [Internet]. 1º de fevereiro de 2021 [citado 26 de dezembro de 2023];148(3):528–45. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32683679/>
196. Lo YMD, Lam WKJ. Tracing the tissue of origin of plasma DNA—feasibility and implications. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];1376(1):14–7. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/306133054_Tracing_the_tissue_of_origin_of_plasma_DNA-feasibility_and_implications
197. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 1º de setembro de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];35(3):347–76. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27392603/>
198. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* [Internet]. 6 de julho de 2016 [citado 27 de dezembro de 2023];8(346). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27384348/>
199. Muhanna N, Di Grappa MA, Chan HHL, Khan T, Jin CS, Zheng Y, et al. Cell-Free DNA Kinetics in a Pre-Clinical Model of Head and Neck Cancer. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. 1º de dezembro de 2017 [citado 27 de dezembro de 2023];7(1):1–11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17079-6>
200. Dahlstrom KR, Li G, Hussey CS, Vo JT, Wei Q, Zhao C, et al. Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer* [Internet]. 1º de outubro de 2015 [citado 26 de dezembro de 2023];121(19):3455–64. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26094818/>
201. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 5 de março de 2001 [citado 27 de dezembro de 2023];1(1):1–8. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-1-2>
202. Liu VWS, Tsang P, Yip A, Ng TY, Wong LC, Ngan HYS. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2001 [citado 27 de dezembro de 2023];82(2):269–72. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11531278/>

203. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, Sridharan G, John S, Shaji R V., et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. novembro de 2004 [citado 27 de dezembro de 2023];31(3):204–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465413/>
204. Gnanamony M, Peedicayil A, Subhashini J, Ram TS, Rajasekar A, Gravitt P, et al. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. março de 2010 [citado 26 de dezembro de 2023];116(3):447–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19922992/>
205. Sabeena S, Ravishankar N. The Short-Term Impact Of COVID-19 Pandemic on Cervical Cancer Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2022 [citado 27 de dezembro de 2023];23(5):1497–504. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35633530/>
206. Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* [Internet]. dezembro de 2005 [citado 26 de dezembro de 2023];99(3):615–21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16099020/>
207. Mutirangura A. Serum/plasma viral DNA: mechanisms and diagnostic applications to nasopharyngeal and cervical carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. setembro de 2001;945:59–67.
208. Garrido RRE, Gutiérrez M, Flores MÁV. Circulating cervical cancer biomarkers potentially useful in medical attention (Review). *Mol Clin Oncol* [Internet]. 1º de fevereiro de 2023 [citado 26 de dezembro de 2023];18(2). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36761385/>
209. Jeannot E, Latouche A, Bonneau C, Calmejane MA, Beaufort C, Ruigrok-Ritstier K, et al. Circulating HPV DNA as a Marker for Early Detection of Relapse in Patients with Cervical Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15 de novembro de 2021 [citado 27 de dezembro de 2023];27(21):5869–77. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34210686/>
210. Bønløkke S, Stougaard M, Sorensen BS, Booth BB, Høgdall E, Nyvang GB, et al. The Diagnostic Value of Circulating Cell-Free HPV DNA in Plasma from Cervical Cancer Patients. *Cells* [Internet]. 1º de julho de 2022 [citado 26 de dezembro de 2023];11(14). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35883612/>
211. Centrone C de C. Detecção de DNA de HPV no plasma para potencial identificação precoce de recidiva de câncer do colo de útero. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2016.
212. Devine C, Viswanathan C, Faria S, Marcal L, Sagebiel TL. Imaging and Staging of Cervical Cancer. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 1º de agosto de 2019;40(4):280–6.
213. Veo CAR, Saad SS, Fregnani JHTG, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, Resende JCP, et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumour Biol* [Internet]. 29 de julho de 2015 [citado 27 de dezembro de 2023];36(7):5399–405. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25677903/>

11 ANEXOS

ANEXO A – Parecer do CEP/FCECON**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES (VIRAIS) E BIOQUÍMICOS NO MONITORAMENTO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE PACIENTES COM CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Pesquisador: MARCIA POINHO ENCARNACAO DE MORAIS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29718720.0.0000.0004

Instituição Proponente: Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.997.504

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 29 de Abril de 2020

Assinado por:
VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS
(Coordenador(a))

12 APÊNDICES

APÊNDICE – A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: **“Identificação de marcadores moleculares virais no monitoramento da resposta terapêutica de pacientes com câncer de colo de útero”**.

Pesquisadoras responsáveis: Márcia Poinho Encarnação de Moraes, Kátia Luz Torres Silva, Valquiria do Carmo Alves Martins.

Instituição responsável pela pesquisa: Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON

A senhora está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado: “Identificação de marcadores moleculares virais no monitoramento da resposta terapêutica de pacientes com câncer de colo de útero”, pois você é maior de 18 anos, apresenta diagnóstico histopatológico confirmando carcinoma invasor, tem indicação de cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia e ainda não fez tratamento para essa doença.

O objetivo deste estudo é acompanhar mulheres antes e após tratamento para o câncer de colo do útero por meio de exames laboratoriais que possam ajudar a detectar se a doença está ocorrendo novamente (recidiva).

A senhora será submetida a coletas de sangue da veia do braço. Essas coletas acontecerão quatro vezes: uma antes do seu tratamento, uma três meses após o início do seu tratamento, outra seis meses após o início do seu tratamento e outra 18 meses após o início do seu tratamento. Haverá também coleta de preventivo, três vezes após seu tratamento, no mesmo período da coleta do sangue.

Os riscos referentes ao estudo são relacionados às coletas das amostras (pois poderá haver algum desconforto, dor ou incômodo no braço no momento da coleta de sangue) na hora da entrevista e na análise do seu prontuário. Para reduzir esses riscos, a senhora será atendida dentro dos serviços de rotina da FCECON, e as coletas serão realizadas por profissionais especializados e por equipe treinada, que também realizarão sua entrevista e acessarão seu prontuário em lugar reservado, sempre garantido o sigilo de todos os seus dados, ou seja, sua identidade pessoal e/ou profissional será excluída de todos e quaisquer produtos da pesquisa.

Não há benefício direto aparente, mas os resultados do estudo irão promover conversas entre profissionais da FCECON e os pesquisadores para verificar a possibilidade de usar esses testes no acompanhamento de mulheres que fizeram tratamento para o câncer de colo do útero a fim de detectar se a doença está ocorrendo novamente.

A sua participação nesta pesquisa é voluntária, não implicará custos adicionais, a senhora não terá qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos

neste estudo, não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação e terá o direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

A senhora poderá retirar-se do estudo a qualquer momento sem que isso cause qualquer prejuízo no seu tratamento ou acompanhamento na FCECON e terá o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Será entregue à senhora uma via idêntica deste documento assinada pelo pesquisador do estudo.

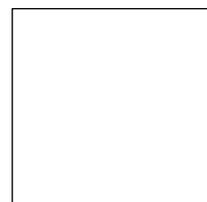
Em qualquer etapa do estudo a senhora terá acesso às pesquisadoras responsáveis pelo projeto para esclarecimento de suas dúvidas, por meio do número 3655-4774 ou por *e-mail*: marciapoinho@hotmail.com ou no terceiro andar da Fundação Centro de Controle de Oncologia – FCECON, no Departamento de Ensino e Pesquisa. Caso a senhora tenha alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCECON – rua Francisco Orellana, 215, 3.º andar – Planalto – Tel.: 3655-4600 ou 3655-4774 – *E-mail*: comitê.etica.pesquisa@fcecon.am.gov.br

O seu material coletado será utilizado exclusivamente para atender aos objetivos deste estudo.

Eu, _____, li e entendi o termo de consentimento e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi tratou de riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que essa decisão afete meu tratamento. Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse. Sendo assim, eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Manaus, ___ de _____ de _____.

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa



Nome e assinatura do pesquisador

APÊNDICE – B
INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS
QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DA PACIENTE

“Identificação de marcadores moleculares virais no monitoramento da resposta terapêutica de pacientes com câncer de colo do útero”.

Identificação no Projeto _____

Dados do estudo

1. Data da abordagem para o estudo: ____ / ____ / ____
2. Responsável pela coleta dos dados: _____
3. Iniciais da paciente: _____
4. Número do prontuário _____
5. Data do nascimento: ____ / ____ / ____

Dados sociodemográficos

6. Cor autodeclarada: () branca () parda () negra () amarela () indígena
7. Nível educacional: () analfabeta () fundamental incompleto () Fundamental completo () médio incompleto () médio completo () superior incompleto () superior completo
8. Estado civil: () solteira () casada () viúva () união estável () divorciada
9. Município de Nascimento: _____ 10. Estado: _____
11. Endereço para contato: _____
12. Município de moradia nos últimos cinco anos _____
13. Telefone: _____ 14. Celular: _____
15. Dados de contatos por mídias sociais (Instagram ou Facebook) _____
16. Telefone de contato de acompanhante _____
17. Ocupação da paciente: _____
18. Renda familiar por mês: () sem salário () 1 salário-mínimo () 2-3 salários-mínimos () ≥ 4 salários-mínimos

Dados comportamentais/epidemiológicos

19. História de tabagismo () nunca () antigo () atual () desconhece
20. Com qual idade iniciou a atividade sexual (sexarca): _____
21. Faz uso de camisinha na relação sexual: () nunca () às vezes () sempre
22. Quantos parceiros sexuais já teve ao longo de sua vida () 1 () 2 a 5 () 6 a 10 () + 10 () desconhecido.

23. Já apresentou infecções sexualmente transmissíveis: () Sim () Não () Não sabe

24. Se sim, qual(is): _____

25. Realiza exame preventivo de câncer do colo do útero com que frequência?

() Nunca realizou () 6 em 6 meses () 1x ao ano () a cada 2 anos () mais de 3 anos () Não sabe

26. Quais os motivos pelos quais não realizou o exame? (se for o caso) () inibição/vergonha () medo () falta de tempo () dificuldade de acesso () falta de conhecimento () outros (especificar): _____

Dados Clínicos

27. Histologia do tumor primário: () adenocarcinoma () escamoso () adenoescamoso () neuroendócrino () indiferenciado () desconhece () outros

28. Estadiamento FIGO: () IA () IA1 () IA2 () IB1 () IB2 () IB3 () IIA () IIA1 () IIA2 () IIB () III () IIIA () IIIB () IIIC () IIIC1 () IIIC2 () IV () IVA () IVB

Tratamento

29. Tratamento instituído: () cirurgia () radioterapia () quimioterapia () quimioterapia neoadjuvante+cirurgia () radioterapia neoadjuvante+cirurgia () quimioterapia neoadjuvante e radioterapia neoadjuvante+cirurgia () quimioterapia+radioterapia () quimiorradiação () cirurgia+quimioterapia adjuvante () cirurgia+radioterapia adjuvante () cirurgia + quimioterapia adjuvante e radioterapia adjuvante.

Cirurgia primária do tumor

30. Data da cirurgia: ____ / ____ / ____

Radioterapia

31. Data de início da radioterapia: ____ / ____ / ____

32. Data de término da radioterapia: ____ / ____ / ____

Braquiterapia

33. Braquiterapia () sim () não

34. Data de início da braquiterapia: ____ / ____ / ____

35. Data de término da braquiterapia: ____ / ____ / ____

Quimioterapia

36. Data de início da quimioterapia: ____ / ____ / ____

37. Data de término da quimioterapia: ____ / ____ / ____

APÊNDICE – C

1 **TÍTULO:** Presença do DNA circulante do HPV no plasma como marcador preditor de
2 recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do câncer de colo do
3 útero.

4 Márcia Poinho Encarnação de Moraes¹, Laura Luiza Moreira da Silva Dias², Layane da Silva Pinheiro²,
5 Flávia Níniver Lima de Oliveira¹, Heidy Halanna de Melo Farah Rondon¹, Mikele Praia de Oliveira¹,
6 Jhonnatan Silva de Souza¹ Higino Felipe Figueiredo³, Daniel Lourenço Lira³, José Eduardo Levi⁴,
7 Valquíria do Carmo Alves Martins^{1,3,5}, Kátia Luz Torres^{1,3,5}

8 **Affiliations:**

- 9 1. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, Programa de Pós-Graduação em
10 Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA, Manaus, Amazonas, Brasil
- 11 2. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil – Faculdade de Ciências
12 Farmacêuticas – FCF, Manaus, Amazonas, Brasil
- 13 3. Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil
- 14 4. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo- Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, São Paulo,
15 Brasil
- 16 5. Rede de Vigilância Genômica em Saúde: Otimização da Assistência e Pesquisa no Estado do
17 Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazonas, Brasil

18 **Corresponding author:**

19 Márcia Poinho Encarnação de Moraes

20 Phone: +55 92 98152 1490

21 E-mail: marciapoinho2017@gmail.com

22 Address: Rua Marquês do Maranhão, 721 – Cond. Quinta das Laranjeiras- Manaus – Amazonas –

23 Brazil ZIP Code: 69058- 204

24 **Abstract**

25 **Background:** O câncer de colo do útero (CCU) é considerado um problema de saúde pública
26 mundial e origina-se a partir da infecção persistente do *Papillomavirus* humano (HPV)
27 oncogênico, principalmente os genótipos 16 e 18. O *follow up* das pacientes, após tratamento
28 do CCU, pode levar a um melhor prognóstico e aumentar a sobrevida dessas mulheres por
29 meio do monitoramento de detecção precoce de recidiva/persistência da doença, o qual pode
30 ser feito pela detecção do cf-DNA do HPV no plasma das pacientes, e a presença do material
31 genético do vírus está associado à tendência de desenvolver recidiva/persistência.

32 **Objectives:** Analisar a presença do DNA circulante livre do HPV (cf- DNA HPV) no plasma como
33 marcador preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento do
34 câncer de colo do útero.

35 **Methods:** Tratou-se de um estudo de coorte prospectivo envolvendo mulheres amazônicas
36 em tratamento na Fundação Centro de Controle de Oncologia, no qual as coletas das amostras
37 ocorreram em quatro momentos: fase zero (antes do início do tratamento), fase 1 (cerca de
38 seis meses após o início do tratamento), fase 2 (cerca de nove meses após o início do
39 tratamento) e fase 3 (cerca de 18 meses após o início do tratamento). As mulheres foram
40 divididas em Grupo A (FIGO IA a IIB) e Grupo B (FIGO IIIA a IVA). Para detecção de HPV, as
41 amostras foram submetidas a ensaio de *real-time* PCR (qPCR) tendo como alvo o gene E7 dos
42 HPV 16 e 18.

43 **Results:** 39 pacientes diagnosticadas com câncer de colo do útero no período de 31 de agosto
44 de 2020 a 30 de setembro de 2022 foram incluídas no estudo, 13 do Grupo A e 26 do Grupo
45 B. A idade variou entre 25 e 80 anos, com idade média $48,4 \pm SD 13,4$; Dezoito mulheres
46 (46,1%) relataram serem analfabetas ou terem ensino fundamental incompleto; 30 (77,0%)
47 não possuíam renda ou possuíam renda de até um salário-mínimo; 31 (79,5%) tiveram a
48 primeira relação sexual entre 12 e 17 anos; 17 (43,6%) foram hiper-rastreadas conforme as
49 diretrizes brasileiras (mais de uma citologia a cada três anos); uma (16,7%) tinha infecção por
50 HIV; 59,1% informaram não fazer o exame de rastreio para o CCU por inibição, vergonha,
51 medo ou falta de tempo; 35 (89,7%) tiveram diagnóstico histopatológico de carcinoma de
52 células escamosas, quatro (10,3%) de adenocarcinoma; 26 (66,5%) apresentaram
53 estágio III-IV. A escolha terapêutica mais frequente foi quimioterapia (QT) e radioterapia
54 (RT) (74,4%); 12 (30,8%) mulheres apresentaram recidiva/persistência após
55 tratamento; quatro (10,3%) foram a óbito; 21 (53,8%) foram positivas antes do tratamento
56 para HPV 16 no plasma e nenhuma para HPV 18; o grupo B apresentou maior frequência de
57 cf-DNA do HPV detectável (81,0%) ($p = 0,041$); uma paciente foi positiva para HPV16
58 nas fases zero, 1 e 2 de modo que na fase 1 houve diminuição do número de cópias de cf-
59 DNA do HPV 16, fato que coincidiu com o término da radioterapia; em paciente que
60 apresentou recidiva/persistência da doença, foi possível detectar o cf-DNA do HPV no
61 plasma seis meses antes do diagnóstico da recidiva/persistência da doença. A data da primeira
62 consulta e o início do tratamento variaram entre um e 29 meses, com valor médio igual a $6 \pm$
63 5 meses.

64 **Conclusions:** A detecção do cf-DNA do HPV é um marcador clinicamente útil na vigilância
65 pós-tratamento do câncer de colo do útero. Cf-DNA do HPV pôde ser detectado 6 meses
66 antes da recidiva/persistência da doença.

67 **Keywords:** HPV, DNA livre, neoplasia do colo uterino, recidiva, Amazonas.

68

69 Introduction

70 O câncer de colo do útero (CCU) é o quarto tipo de neoplasia maligna mais prevalente
71 nas mulheres, caracterizando um sério problema de saúde pública, especialmente nos países
72 em desenvolvimento. No mundo a incidência e a mortalidade desse câncer é de 604.127
73 casos/ano e 341.831 óbitos/ano (1,2). No Brasil, foram estimados 17.010 casos novos de
74 câncer de colo do útero para cada ano do triênio 2023-2025, com incidência estimada de 15,38
75 casos a cada 100 mil mulheres. Em termos de mortalidade em 2020, ocorreram 6.627 óbitos,
76 e a taxa de mortalidade bruta por câncer de colo do útero foi de 6,12 mortes a cada 100 mil
77 mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCU é o segundo mais
78 incidente na Região Norte do País (20,48 casos/100 mil mulheres). No Estado do Amazonas a
79 taxa de incidência ajustada é de 31,7 novos casos por 100 mil mulheres para o ano de 2023 e
80 uma taxa de mortalidade ajustada de 14,49 óbitos por 100 mil mulheres em 2020 (3).

81 Potencialmente, todos os casos de câncer de colo do útero estão relacionados à infecção
82 persistente pelo *Papillomavirus* humano oncogênico (HPV). O contínuo avanço para melhoria
83 na investigação dessa doença levou à descoberta de DNA livre de células circulantes (cf-DNA)
84 no soro e no plasma de pacientes com essa enfermidade, o que possibilitou a abertura de um

85 novo campo de pesquisa no diagnóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento (4).
86 O DNA tumoral circulante (ctDNA) é um tipo de cfDNA sérico encontrado em pacientes com
87 câncer e contém informações abundantes sobre as características do tumor, destacando seu
88 potencial valor diagnóstico no cenário clínico (5). Nesse sentido, o DNA circulante do HPV
89 (cf- DNA HPV) tornou-se um foco importante para o diagnóstico precoce e para o prognóstico
90 no câncer de colo do útero (6).

91 A alta morbimortalidade pelo câncer de colo do útero no estado do Amazonas, que é o
92 maior estado do Brasil com uma área geográfica de 1.559.159.148 km² (região norte do país),
93 é atribuída ao retardo ao diagnóstico e ao início do tratamento (7). A dificuldade de acesso
94 aos serviços de saúde é uma realidade, pois existem grandes desafios geoespaciais, culturais
95 e ambientais, que incluem enchentes e secas sazonais da Região Amazônica. A infraestrutura
96 hospitalar é insuficiente; existem poucas unidades de saúde pelo Sistema Único de Saúde
97 (sistema público de saúde), que oferecem o exame colposcópico e que estão localizadas apenas
98 na capital, Manaus. Logo, as mulheres residentes no interior do Estado lidam, diariamente,
99 com a falta de infraestrutura e difícil acesso à saúde, o que leva à chegada tardia ao hospital
100 de referência no tratamento de lesões precursoras e do câncer (8–10).

101 Quanto mais o diagnóstico é retardado, maiores as chances de as mulheres apresentarem
102 doença avançada ao diagnóstico inicial, o que compromete outros órgãos e resulta em
103 tratamentos mais agressivos e em menores chances de cura da paciente. Estudo de revisão
104 sistemática e meta-análise demonstrou a utilização do teste de cf- DNA HPV na detecção
105 precoce de recidiva em mulheres em tratamento para o CCU (11). Nesse sentido, o
106 objetivo deste estudo foi analisar a presença do DNA circulante do HPV no plasma como

107 marcador/preditor de recidiva/persistência de doença no acompanhamento do tratamento
108 do câncer de colo do útero.

109

110 **Materials and Methods**

111 **Enrollment**

112 Trinta e nove pacientes com diagnóstico de câncer de colo do útero, atendidas na
113 Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, no período de
114 31 de agosto de 2020 a 30 de setembro de 2022, participaram do estudo. Não foram
115 envolvidas mulheres com doença metastática ao diagnóstico. O seguimento ocorreu em
116 quatro momentos: fase zero (antes do início do tratamento), fase 1 (cerca de seis meses após
117 o início do tratamento), fase 2 (cerca de nove meses após o início do tratamento) e fase 3
118 (cerca de 18 meses após o início do tratamento). As mulheres foram divididas em 2 grupos A
119 (IA a IIB) e B (IIIA a IVA), conforme classificação da Federação Internacional de Ginecologia e
120 Obstetrícia (FIGO). Todas as pacientes foram convidadas a participar da pesquisa, assinando o
121 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE e respondendo ao questionário, no qual
122 foram coletados dados sociodemográficos, clínicos e de risco para infecção pelo HPV. Para
123 este estudo, caracterizou-se como recidiva/persistência da doença a presença de sinais e de
124 sintomas (como sangramento vaginal persistente, dor abdominal com queixas urinárias e
125 intestinais) descritos na evolução clínica, consultados nos prontuários das pacientes. Esta
126 análise levou em consideração as observações médicas sobre estado clínico da paciente, bem
127 como os exames histopatológicos e/ou de imagens do seguimento terapêutico. O estudo foi

128 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON – Parecer aprovado 3.997.504, 29 de
129 abril de 2020.

130 **Biological Samples Collection and Processing**

131 Na fase zero (antes do tratamento), a coleta de tecido ocorreu sempre que houve
132 indicação clínica, no ambulatório, durante a primeira consulta da paciente; ou no centro
133 cirúrgico, durante o ato cirúrgico. O tamanho do fragmento coletado foi de aproximadamente
134 3 a 5 mm de tecido tumoral e armazenado em microtubo plástico seco livre de DNase e RNase.
135 As amostras foram armazenadas a -30 °C até serem processadas. A amostra de sangue foi
136 coletada em tubos PPT™ (*Plasma Preparation Tube*) PLUS (BD Vacutainer®, USA) com gel
137 separador de 5mL por punção venosa e processada, para obtenção do plasma, dentro de duas
138 horas após a coleta, por meio de centrifugação a 1.400-1.600g por dez minutos. O plasma foi
139 separado em alíquotas e armazenado a -30°C. Antes da extração de DNA, uma segunda
140 centrifugação de alta velocidade de 16.000g por dez minutos a 4°C foi realizada para garantir
141 a eliminação de restos celulares. O material cérvico vaginal foi coletado nos casos em que a
142 paciente foi indicada para tratamento não cirúrgico, sem indicação clínica para coleta de
143 fragmento de tecido tumoral; a coleta ocorreu no ambulatório utilizando-se escova Cervex-
144 Brush® Combi (Rovers® Medical Devices B.V The Netherlands). Ao término da coleta, a cabeça
145 da escova, que é removível, foi acondicionada no frasco contendo solução conservante de
146 tiocianato de guanidina- 4M. O frasco foi levado ao vórtex durante 15 segundos; em seguida
147 a amostra foi separada em alíquotas e armazenada a -30°C. As coletas das amostras de sangue
148 durante o *follow up* foram feitas de acordo com as visitas ao hospital, seja para consulta
149 odontológica, médica, psicológica, serviço social, fisioterapia e de algumas visitas domiciliares,

150 juntamente com o serviço social da FCECON. A triagem molecular para detecção do DNA do
151 HPV 16 e 18 foi realizada inicialmente nas amostras provenientes da lesão tumoral (tecido ou
152 material cérvico vaginal). Somente as pacientes com as amostras de lesão tumoral detectáveis
153 para DNA do HPV 16 e/ou 18 seguiram para análise no plasma e o *follow up*.

154 **DNA extraction**

155 **Tecido-** o DNA tecidual foi extraído do tecido congelado utilizando o *kit* DNeasy® Blood
156 & Tissue Kit (QIAGEN Inc., USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume
157 final de DNA extraído foi de 200 µl, e a alíquota foi armazenada a -30°C.

158 **Plasma-** O DNA foi extraído do plasma congelado utilizando o *kit* ReliaPrep™ Blood gDNA
159 Miniprep System (Promega Inc., USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O
160 volume final de DNA extraído foi de 40 µl, e a alíquota foi armazenada a -30°C.

161 **Cérvico vaginal** – A extração de DNA, a partir do material cérvico vaginal, foi realizada
162 utilizando o *kit* comercial ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega Inc., USA)
163 seguindo instruções do fabricante. O volume final de DNA extraído foi de 60 µl, e a alíquota
164 foi armazenada a -30°C.

165

166

167 Human β -actina PCR

168 Para controle de qualidade da extração de DNA, o gene da β -actina humana foi
169 amplificado por reação em cadeia da polimerase (qPCR) utilizando as sequências Primer F: (5'
170 CCATCTACGAGGGGTATGC'3) e Primer R: (5' GGTGAGGATCTTCATGAGGTA'3) e sonda (5'VIC-
171 CCTGCGTCTGGACCTGGCTG-NFQ 3') (Life Technologies, São Paulo, Brasil), num volume de
172 reação final de 10,0 μ L. Cada reação qPCR continha 1X mistura principal TaqMan (Applied
173 Biosystems, Foster City, CA), 300 nM de cada um dos *primers* direto e reverso, 100nM de
174 sonda fluorogênica TaqMan e 50-100 ng de DNA. As condições de amplificação consistiram
175 em 50°C por dois minutos; e 95°C por dez minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15
176 segundos, 55°C por um minuto e 60°C por um minuto.

177 E7 HPV16/HPV18 type-specific quantitative real-time PCR (qPCR)

178 Todas as amostras foram submetidas a dois ensaios específicos de qPCR em tempo real
179 baseados em TaqMan visando o gene E7 de HPV16 e de HPV18 em um sistema de PCR em
180 tempo real QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific© Inc, USA). Todas as amostras e os
181 controles foram executados em duplicata.

182 **HPV16-E7** – o ensaio qPCR incluiu os seguintes *primers*: *primer forward*
183 (5'GATGAAATAGATGGTCCAGC3') e *primer reverse* (5'GCTTTGTACGCACAACCGAAGC3') e a
184 sonda (5'FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGB-NFQ) num volume final de 12,5 μ L. Cada reação
185 de qPCR continha 1X da mistura principal TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), 375
186 nM de cada um dos *primers forward e reverse*, 125 nM de sonda fluorogênica TaqMan e 50-

187 100 ng de DNA. As condições de amplificação consistiram em 50°C por dois minutos; e 95°C
188 por dez minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por um minuto e 60°C
189 por um minuto. O DNA de uma linhagem celular SiHa que contém 1-2 cópias de HPV 16
190 integrado por célula foi utilizado como controle positivo em todas as reações (12).

191 **HPV18-E7** – o ensaio qPCR incluiu os seguintes *primers*: *primer forward*
192 (5'AAGAAAACGATGAAATAGATGGA3') e *primer reverse* (5'GGCTTCCACCTTACAACACA3') e a
193 sonda (5'VIC-AATCATCAACATTTACCAGCC-MGBNFQ3') num volume final de 12,5 µL – cada
194 reação de qPCR continha 1X da mistura principal TaqMan (Applied Biosystems, Foster City,
195 CA), 375 nM de cada um dos *primers* forward e reverse, 125 nM de sonda fluorogênica
196 TaqMan, e 50-100 ng de DNA. As condições de amplificação consistiram em 50°C por dois
197 minutos; e 95°C por dez minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por um
198 minuto e 60°C por um minuto. O DNA da linhagem celular HeLa que contém 10-20 cópias de
199 HPV 18 integrado por célula foi utilizado como controle positivo em todas as reações (12).

200 **HPV 16 viral load in plasma sample** – foi construída uma curva-padrão, utilizando DNA
201 extraído de células SiHa, (uma cópia de HPV 16/célula) na concentração 55,6 ng/µL.
202 Inicialmente 100 µL do DNA extraído de células SiHa foram adicionados a 300 µL de plasma
203 negativo. Sabendo-se que uma célula diploide possui 6,6 pg de DNA e que a linhagem celular
204 SiHa possui uma cópia de HPV 16 em um volume final de 400 µL, uma série de diluições
205 seriadas (1:10) foi realizada para gerar a curva-padrão, seguindo as recomendações do MIQE
206 *Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments)*
207 (13).

208

209 **Statistical analysis**

210

211 As análises descritivas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%)
212 e demonstradas por meio de tabelas e gráficos. A presença de positividade do DNA circulante
213 do HPV no plasma antes e durante o tratamento, considerando os períodos deste estudo (T1
214 a T3), foi apresentada por meio *Swimmer Plot*, elaborado no programa Microsoft Excel e
215 *Adobe illustrator*. A análise de sobrevida foi realizada considerando o método de Kaplan-
216 Meier, tendo sido as comparações da sobrevida por fatores realizadas pelo teste de Log-Rank.
217 O tempo de sobrevida considerou a data do início do tratamento das pacientes e a data de
218 óbito ou a data final de seguimento de cada paciente neste estudo. Para as três pacientes que
219 não realizaram tratamento, considerou-se como data inicial a data de entrada neste estudo.
220 A análise do Δt correspondeu ao período decorrido a partir da primeira consulta até a data de
221 início do tratamento das mulheres. A relação entre as características clínicas (estadiamento)
222 e histopatológicas das pacientes, com a presença dos marcadores utilizados no seguimento,
223 foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado de Pearson. As análises foram realizadas no programa
224 estatístico IBM SPSS Statistics versão 21. Em todas as comparações, utilizou-se o nível de 5%
225 de significância.

226 **Results**

227 Foram incluídas no estudo 39 pacientes atendidas na FCECON, no período de agosto de
228 2020 a setembro de 2022, sendo 13 do Grupo A (FIGO IA a IIB) e 26 do Grupo B (FIGO III A a
229 IVA). Quanto ao perfil sociodemográfico, a idade variou entre 25 e 80 anos, com idade média
230 de $48,4 \pm SD 13,4$; 14 pacientes (35,9%) estavam na faixa etária de 21 a 40 anos; 17 (43,6%),
231 entre 41 e 55 anos. Em relação ao nível escolar, observou-se que 46,1% das mulheres

232 relataram serem analfabetas ou terem ensino fundamental incompleto (tabela 1). A maioria
 233 (48,6%) das pacientes incluídas no estudo são do lar/domésticas; e, quanto à renda familiar,
 234 evidenciou-se que 30 (77,0%) não possuem renda, ou possuem renda de até um salário-
 235 mínimo tabelado no Brasil (tabela 2).

236 **Tabela 1** - Caracterização sociodemográfica das pacientes com câncer de colo do útero atendidas na
 237 FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	n (39)	%
Faixa Etária		
21 a 40	14	35,9
41 a 55	17	43,6
56 a 65	2	5,1
> 65	6	15,4
Etnia		
Branca	3	7,7
Negra	1	2,6
Parda	35	89,7
Nível Escolar		
Analfabeta	6	15,4
Fundamental incompleto	12	30,7
Fundamental completo	1	2,6
Médio completo	15	38,4
Superior incompleto	1	2,6
Superior completo	4	10,3
Estado Civil		
Solteira	14	35,9
Casada	17	43,6
Divorciada	2	5,1
Viúva	6	15,4
Local de nascimento		
Capital	9	23,1
Interior	19	48,7
Outros Estados	11	28,2
Moradia nos últimos cinco anos		
Capital	25	64,1
Interior	11	28,2
Outros Estados	3	7,7

238 n: Frequência absoluta; %: Frequência relativa

239

240

241

242

243

244 **Tabela 2.** Perfil socioeconômico das pacientes com câncer de colo do útero, atendidas na FCECON, no
 245 período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	n (39)	%
Ocupação		
Açougueira	1	2,6
Agente de saúde	1	2,6
Agricultora	2	5,1
Autônoma	2	5,1
Auxiliar de lavanderia	1	2,6
Costureira	1	2,6
Cozinheira geral	1	2,6
Diarista	1	2,6
Do lar / Doméstica	19	48,6
Estudante	1	2,6
Fisioterapeuta	1	2,6
Funcionária pública	1	2,6
Mediadora	1	2,6
Professora	2	5,1
Serviços gerais	3	7,5
Supervisora de almoxarifado	1	2,6
Renda Familiar		
Sem renda	15	38,5
Até 1 SM	15	38,5
2 a 3 SM	8	20,5
> 3 SM	1	2,5

246 n: Frequência absoluta; %: Frequência relativa
 247 SM: Salário mínimo no Brasil (U\$ 286,00)

248
 249 Ao se avaliar o comportamento e os hábitos das mulheres ou possíveis fatores de risco
 250 relacionados ao CCU, observou-se que 31 (79,5%) tiveram a primeira relação sexual (sexarca)
 251 entre 12 e 17 anos; 24 mulheres (61,5%) tiveram entre dois e cinco parceiros ao longo da vida
 252 e fazem uso de preservativo às vezes. Observou-se que 17 (43,6%) mulheres foram hiper-
 253 rastreadas conforme as diretrizes brasileiras de rastreamento (mais de uma citologia a cada
 254 três anos); 18 (46,1%) eram hiporrastreadas (menos de uma citologia a cada três anos); e
 255 quatro (10,3%) não souberam informar. Observou-se que seis (15,4%) pacientes informaram
 256 que foram acometidas por alguma infecção sexualmente transmissíveis (IST). Destas seis, uma
 257 (16,7%) foi infectada com HIV (tabela 3).

258 **Tabela 3** - Caracterização dos fatores comportamentais e de risco das pacientes com câncer de colo do
 259 útero, atendidas na FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	n (39)	%
Sexarca		
Entre 12 e 14 anos	12	30,8
Entre 15 e 17 anos	19	48,7
A partir dos 18 anos	7	17,9
Não informou	1	2,6
Nº de parceiros		
Apenas 1	4	10,3
De 2 a 5	24	61,5
De 6 a 10	8	20,5
> 10	1	2,6
Desconhecido	2	5,1
Uso de preservativo		
Às vezes	24	61,5
Sempre	1	2,6
Nunca	14	35,9
Teste Citológico de Triagem		
6 em 6 meses	3	7,7
1 vez ao ano	9	23,1
2 em 2 anos	5	12,8
Mais de 3 anos	12	30,7
Nunca realizou	6	15,4
Não soube informar	4	10,3
Contato com o tabaco		
Sim	15	38,5
Não	24	61,5
ISTs		
Sim	6	15,4
Não	23	59,0
Não sabe	10	25,6
Qual IST	n (6)	%
HIV	1	16,7
Sífilis	1	16,7
Não sabe	4	66,6

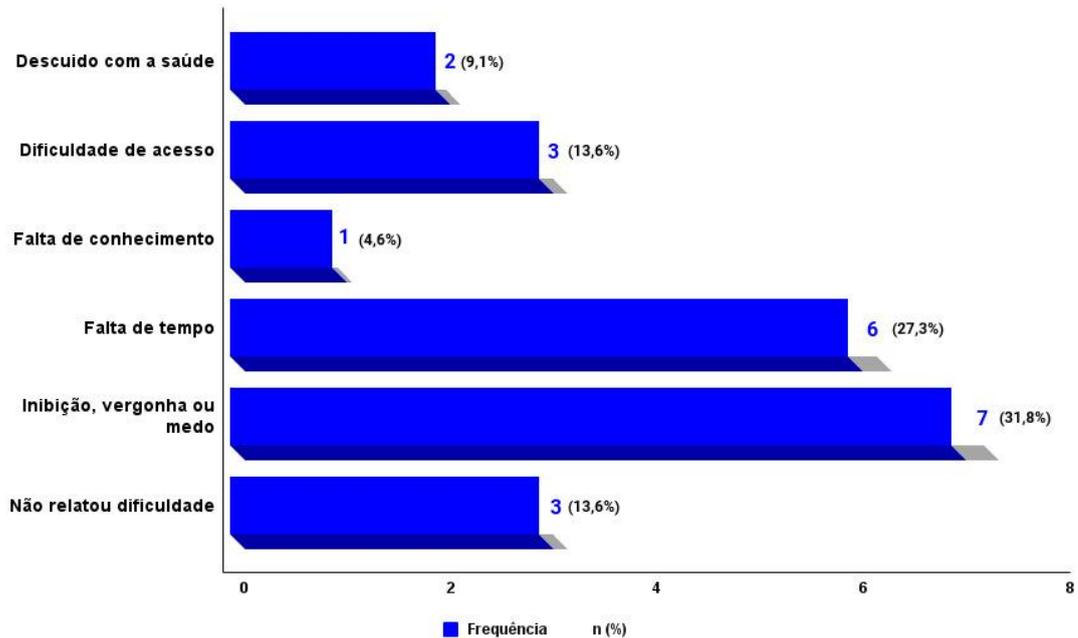
260 n:Frequência absoluta; %: Frequência relativa; IST: Infecções
 261 Sexualmente Transmissíveis; HIV: Vírus da imunodeficiência humana.

262

263 Quanto às barreiras para não realização do exame de rastreamento do CCU 59,1% das
 264 mulheres relataram inibição, vergonha, medo ou falta de tempo (Gráfico 1).

265

266 **Gráfico 1.** Barreiras pelas quais as pacientes com câncer de colo do útero, atendidas na FCECON no período de
 268 agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil, não realizavam o preventivo rotineiramente



269 No que se refere ao tipo histológico, 35 (89,7%) mulheres tiveram diagnóstico
 270 histopatológico de carcinoma de células escamosas; e quatro (10,3%), de adenocarcinoma.
 271 Quanto ao estadiamento FIGO, vinte e seis (66,5%) apresentavam estádios III e IV. A escolha
 272 terapêutica mais frequente foi quimioterapia (QT) e radioterapia (RT) (74,4%), entretanto três
 273 (7,7%) pacientes não realizaram tratamento. Os motivos relatados da não realização do
 274 tratamento foram: indicação direta de tratamento paliativo, sem condições financeiras para
 275 transporte até a FCECON (paciente moradora do Careiro Castanho – interior do Estado do
 276 Amazonas) e decisão de voltar para seu município (paciente do interior do Estado do Pará)
 277 (tabela 4).

278

279

280

281
282**Tabela 4.** Caracterização clínica das pacientes com câncer de colo do útero, atendidas na FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	n (39)	%
Tipo Histológico		
ADC	4	10,3
CEC	35	89,7
Estadiamento (FIGO)		
IA2	1	2,6
IB1	3	7,7
IB2	2	5,1
II	1	2,6
IIA	1	2,6
IIB	4	10,3
IIC1	1	2,6
III	5	12,7
IIIB	6	15,3
IIIC	1	2,6
IIIC1	9	23,1
IIIC2	2	5,1
IVA	3	7,7
Tratamento		
Cirúrgico	7	17,9
QT + RT	29	74,4
Não realizou tratamento	3	7,7

283
284
285
286
287

n: Frequência absoluta; %: Frequência relativa; **ADC**: Adenocarcinoma; **CEC**: Carcinoma de células escamosas; **QT**: Quimioterapia; **RT**: Radioterapia; **FIGO**: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria

288

289

290

291

292

293

294

Ao se analisar a condição da resposta terapêutica (desfecho) das 39 mulheres, 12 (30,8%) apresentaram recidiva/persistência e quatro (10,3%) foram a óbito. Das 12 pacientes que tiveram recidiva/persistência, uma (2,6%) era do grupo A; e 11, do grupo B (28,2%) (tabela 5).

295 **Tabela 5** – Frequência de casos de recidiva/persistência das pacientes com câncer de colo do útero,
 296 atendidas na FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	%	
Recidiva/Persistência (n=39)		
Sim	12	30,8
Não	24	61,5
Não realizou tratamento	3	7,7
FIGO (n = 12)		
Grupo A	1	2,6
Grupo B	11	28,2
Desfecho (n=39)		
Óbito	4	10,3
Sobrevivente	35	89,7

297

298 A detecção e a genotipagem de HPV presente no plasma foram realizadas nas 39
 299 amostras das pacientes com câncer de colo do útero, das quais 21 (53,8%) foram positivas
 300 para HPV 16 e 18 (46,2%) amostras de plasma foram não detectáveis no tempo T₀ (antes do
 301 início do tratamento).

302 Ao se observar o *follow up* das pacientes, notou-se que no T₀ 53,8% das mulheres
 303 apresentaram cf- DNA HPV detectável (cDNA HPV); e no T₃ (18 meses após
 304 tratamento) 16,7% permaneceram detectáveis (tabela 6). Entretanto, não houve diferença
 305 estatística entre os tempos.

306 **Tabela 6** - Frequência da positividade do cf- DNA HPV das pacientes com câncer de colo do
 307 útero, atendidas na FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

TEMPO	DNA Circulante do HPV						
	Coletado (n)	%	Detectável	%	Não detectável	%	p*
T ₀	39	100	21	53,8	18	46,2	
T ₁	7	17,9	2	28,6	5	71,4	0,410
T ₂	11	28,2	2	18,2	9	81,8	0,046
T ₃	6	15,4	1	16,7	5	83,3	0,187

308

309

310

*Valor de p significativo para p<0,05 (5%)
 Teste Exato de Fisher

311 A tabela 7 demonstra a análise entre as características clínicas das pacientes e a
 312 presença do cf- DNA HPV. A relação entre o estadiamento FIGO e a presença do cf- DNA HPV
 313 nas 39 mulheres mostrou que o grupo B – estágio avançado – apresentou maior frequência
 314 de cf- DNA HPV detectável (81,0%), com um p valor de 0,041. Quanto à presença
 315 recidiva/persistência da doença, observou-se que 6 (33,3%) mulheres apresentaram esse
 316 quadro e quatro (19%) foram a óbito.

317

318 **Tabela 7.** Relação entre as características clínicas das pacientes com o cf-DNA HPV 16, atendidas na
 319 FCECON, no período de agosto de 2020 a setembro de 2022, Manaus – AM, Brasil.

Variáveis	cf-DNA HPV				n (39)	p^*
	Detectável (n=21)	%	Não detectável (n =18)	%		
FIGO						
Grupo A	4	19,0	9	50,0	13	0,041*
Grupo B	17	81,0	9	50,0	26	
Histopatológico						
ADC	2	9,5	2	11,1	4	0,636
CEC	19	90,5	16	88,9	35	
Recidiva/recorrência						
Sim	6	28,6	6	33,3	12	0,491
Não	15	71,4	12	66,7	27	
Desfecho						
Óbito	4	19,0	0	0,0	4	0,073
Sobrevivente	17	81,0	18	100,0	35	

320

*Valor de p significativo para $p < 0,05$ (5%)

321

Teste Qui-Quadrado de Pearson

322

323 Durante o *follow up* não foi possível obter a coleta de plasma de todas as pacientes
 324 deste estudo para a detecção de cf-DNA HPV. Entretanto, houve o
 325 acompanhamento clínico das 39 pacientes. Sendo assim, de 16 pacientes que tiveram coleta
 326 antes e após o tratamento, 11 (68,75% – 11/16) foram positivas para cf-DNA HPV no momento
 327 do diagnóstico e quatro (25,0% – 4/16) foram positivas em pelo menos uma amostra após o
 328 tratamento. A trajetória das 39 pacientes incluídas no estudo pode ser verificada na figura 1.

329 A paciente n.º 2 foi positiva para o cf-DNA HPV no T₀ (carga viral=1.940 cópias/mL),
330 estadiamento IIIC, tipo histológico CEC, 39 anos. No T₃ (18 meses após o tratamento) o cf-DNA
331 HPV foi indetectável, mas a recidiva/persistência clínica foi detectada 33 meses após o
332 tratamento.

333 A paciente n.º 6 foi positiva para o cf-DNA HPV no T₀ (carga viral= 40.330 cópias/mL),
334 estadiamento IVA, tipo histológico CEC, 53 anos. Não houve coleta no T₁ nem no T₂. No T₃
335 (carga viral=5,13 cópias/mL), a recidiva/persistência da doença foi detectada 26 meses após
336 o tratamento. Portanto, o cf-DNA HPV foi detectado nove meses antes do diagnóstico clínico
337 da recidiva/persistência da doença.

338 A paciente n.º 8 foi positiva para o cf-DNA HPV no T₀ (carga viral=7.470 cópias/mL),
339 estadiamento IIIC2, tipo histológico CEC, 36 anos. Nos T₁, T₂ e T₃ o cf-DNA HPV foi indetectável,
340 mas a recidiva/persistência da doença ocorreu 23 meses após o tratamento.

341 Quanto à paciente n.º 10, estadiamento IIIC, tipo histológico CEC, 53 anos, durante o
342 *follow up* não foi detectada a presença de cf-DNA HPV, porém os T₁ e T₃ não foram coletadas as
343 amostras.

344 A paciente n.º 12 foi positiva para cf-DNA HPV no T₀ (carga viral= 54.720 cópias/mL),
345 estadiamento IIIC1, tipo histológico CEC, 41 anos. Foi relatado que a paciente apresentou
346 intercorrência clínica durante a quimioterapia, sendo essa etapa do tratamento não concluída.
347 Foram realizadas as coletas T₁ (carga viral= 6.120 cópias/mL) e T₂ (carga viral= 68.090
348 cópias/mL). No T₁ houve diminuição do número de cópias de HPV16, fato que se alinhou com
349 o término da radioterapia. A recidiva/persistência da doença foi detectada 14 meses após
350 o tratamento. A paciente foi a óbito 16 meses após o tratamento.

351 A paciente n.º 13 foi positiva para o cf-DNA HPV no T₀ (carga viral= 43.400 cópias/mL),
352 estadiamento IIIC1, tipo histológico CEC, 61 anos. No T₂ (nove meses após o tratamento) o
353 cf-DNA HPV foi indetectável; não houve coleta no T₃ (18 meses após o tratamento); a
354 recidiva/persistência da doença foi detectada 23 meses após o tratamento.

355 A paciente n.º 20 o cf-DNA HPV foi detectável no T₀ (carga viral= 5.800 cópias/mL),
356 indetectável no T₁ e no T₂ (carga viral= 1.070 cópias/mL), estadiamento III B, CEC, 49 anos. Não
357 houve coleta no T₃.

358 A paciente n.º 24 não apresentou cf-DNA HPV no T₀, estadiamento IIIB, CEC, 52 anos,
359 cf-DNA HPV detectável no T₁ (carga viral= 920 cópias/mL); a recidiva/persistência da doença
360 foi identificada 13 meses após o tratamento. Portanto, o cf-DNA HPV no plasma foi detectado
361 seis meses antes do diagnóstico clínico da recidiva/persistência da doença.

362

363

364

365

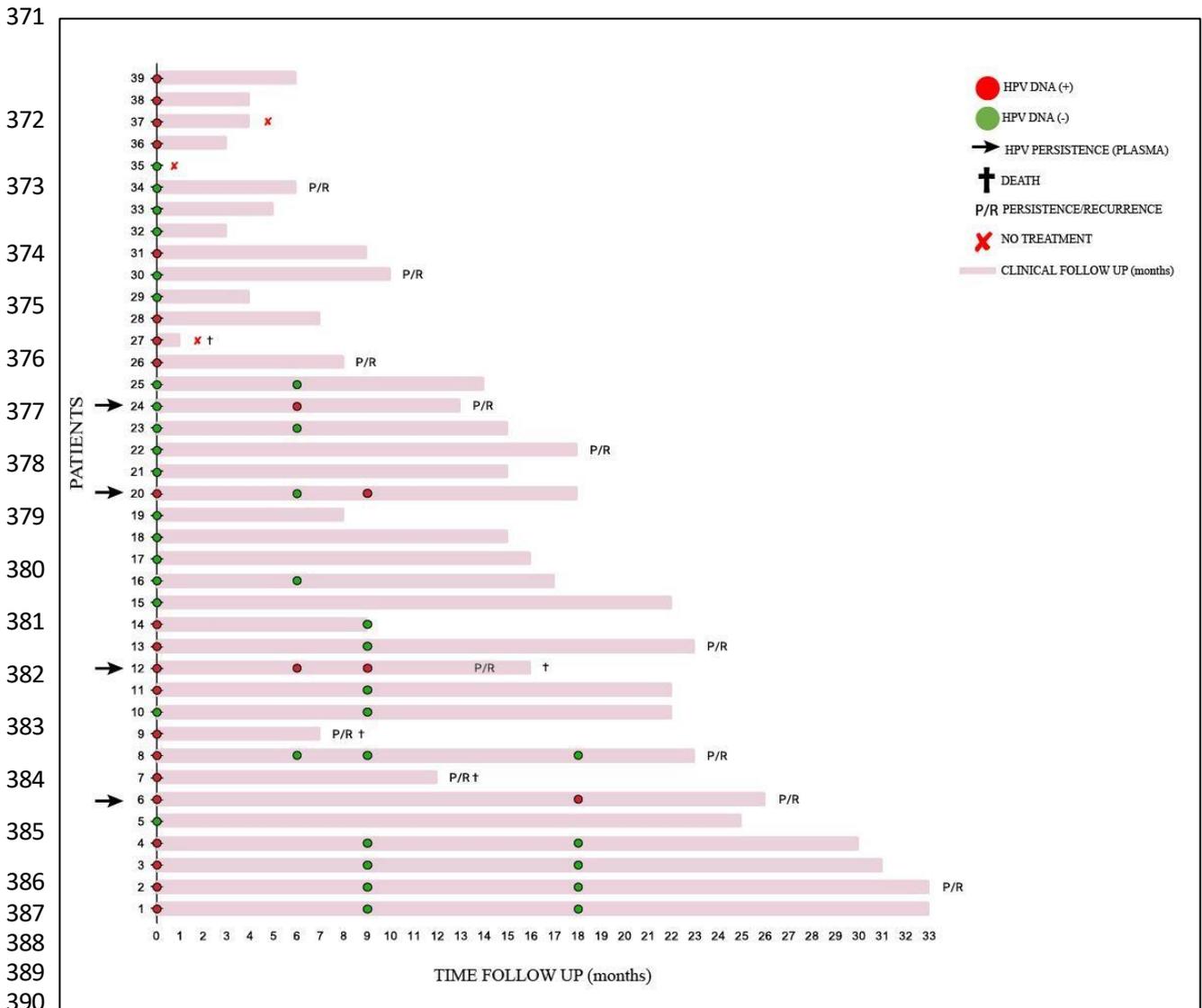
366

367

368

369

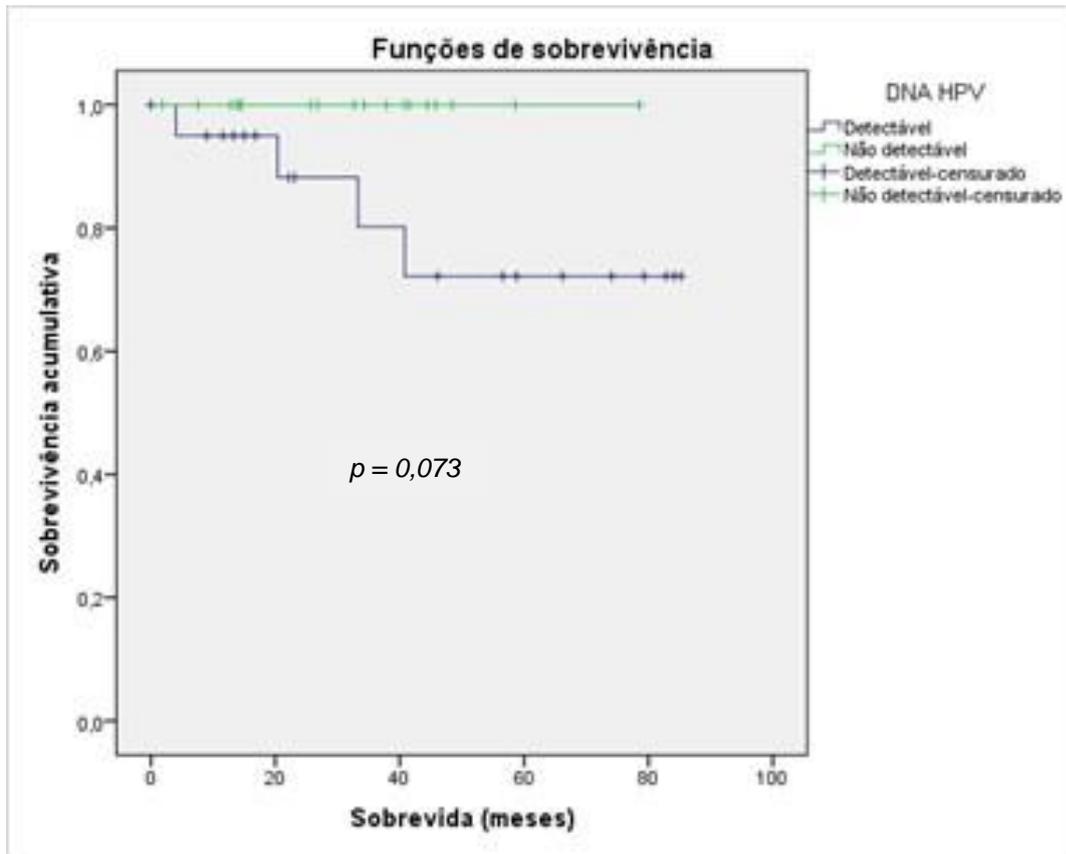
370 **Figura 1- Follow up clínico das 39 pacientes com câncer de colo do úter atendidas na FCECON, no período**
 371 **de 2022, Manaus-AM, Brasil**



Cada linha corresponde a uma paciente (n= 39); Em vermelho (●) e verde (●) correspondem às amostras de plasma positivas para DNA circulante do HPV e negativas para DNA circulante do HPV, respectivamente. Pacientes com DNA circulante do HPV detectáveis em suas amostras durante o tratamento são indicados por uma seta preta; † indica pacientes que foram a óbito; P/R pacientes que apresentaram persistência/recidiva; X pacientes que não realizaram tratamento.

398 A figura 2 apresenta a curva de sobrevida de Kaplan-Meier, considerando como fator
 399 o resultado do DNA plasmático das mulheres submetidas à coleta do plasma. De acordo com
 400 o gráfico, as mulheres consideradas detectáveis ao cf-DNA HPV tiveram tendência
 401 a sobreviver menos tempo do que as mulheres não detectáveis, porém essa diferença entre
 402 as sobrevidas em ambos os grupos não foi estatisticamente significativa (p=0,073).

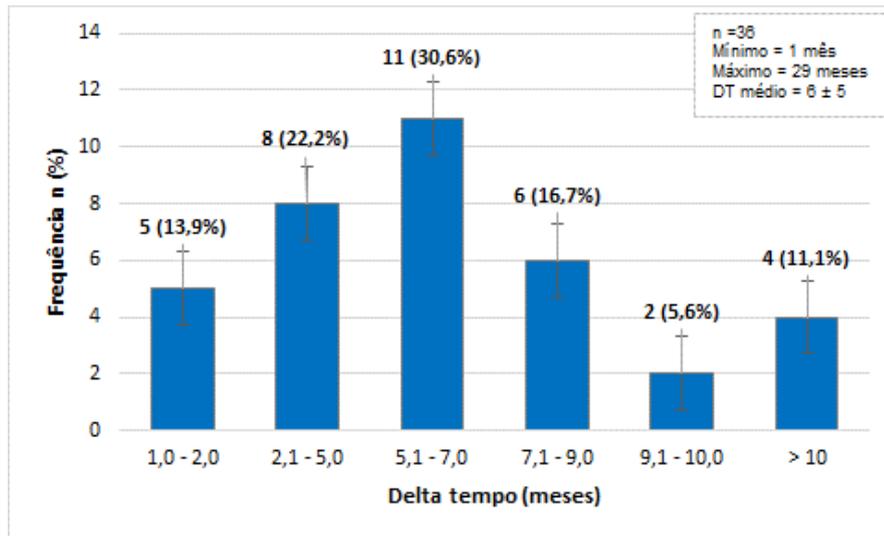
403 **Figura 2.** Análise de sobrevivência das pacientes por resultado do cf-DNA HPV nas mulheres
 404 acompanhadas no seguimento após tratamento na FCECON.



405

406 O Delta tempo (ΔT) foi calculado considerando a data da primeira consulta e o início
 407 do tratamento das 36 mulheres em seguimento terapêutico. O ΔT variou entre um e 29 meses,
 408 sendo seu valor médio igual a 6 ± 5 meses. Observou-se que o valor do desvio-padrão foi muito
 409 próximo ao valor médio ($\Delta T = 6$ meses), caracterizado por um viés devido ao ΔT de uma
 410 paciente (29 meses). Destaca-se que a maioria das pacientes obtiveram um ΔT entre 5,1 e 7,0
 411 meses com 30,6%; e 11,1% obtiveram um $\Delta T > 10$ meses (gráfico 2).

412 **Gráfico 2** – Delta tempo (ΔT) entre a data da primeira consulta e o início do tratamento das mulheres.



413

414

415 Discussion

416 O uso de detecção de cf-DNA HPV como marcador prognóstico de
 417 recidiva/persistência de doença em pacientes acompanhadas após o tratamento do câncer de
 418 colo de útero foi avaliado neste estudo. A aplicação deste marcador foi analisada no contexto
 419 do seguimento de pacientes oriundas de uma região do norte do Brasil onde há alta
 420 prevalência de câncer de colo de útero e que na maior parte das vezes é causada por
 421 dificuldade de acesso ao diagnóstico e ao tratamento da doença.

422 Os atrasos no diagnóstico e no tratamento do câncer de colo do útero podem ocorrer
 423 por diversos fatores, relacionados à paciente, aos profissionais e ao acesso e à organização
 424 dos serviços de saúde (14,15). Entretanto, no ano de 2020, somou-se a esses fatores o efeito
 425 da pandemia causada pelo novo coronavírus, pois os serviços assistenciais tiveram o encargo
 426 de conter o avanço do vírus SARS-COV-2, o que culminou em atrasos na triagem e no
 427 diagnóstico de lesões cervicais. Esse cenário trouxe à tona as fragilidades dos sistemas de

428 saúde, em particular o do Brasil, além de constatar, com maior intensidade, as imensas
429 desigualdades sociais presentes no País, sobretudo na Região Norte.

430 O Amazonas é o maior estado do Brasil; está localizado na Região Norte, com uma área
431 geográfica de 1.559.159.148 km². A dificuldade de acesso aos serviços de saúde é devido às
432 suas características geográficas, com grandes desafios culturais, geoespaciais e ambientais,
433 incluindo enchentes e secas sazonais da Região Amazônica(16). Quanto à infraestrutura
434 hospitalar, existem somente cinco unidades de saúde pelo SUS, que oferecem o exame de
435 colposcopia e que estão localizados na capital, Manaus. Vale-se ressaltar que 71,5% da
436 população brasileira depende do acesso ao serviço público de saúde (17). As mulheres
437 residentes no interior do Estado do Amazonas lidam, diariamente, com a falta de
438 infraestrutura e com o difícil acesso à saúde, o que as leva ao direcionamento tardio para o
439 hospital de referência no tratamento do câncer. Nesse sentido, 26 (66,6%) das pacientes deste
440 estudo foram classificadas no grupo B (FIGO IIIA a IVA), com destaque para o estágio IIIC1
441 (23,1%). Esses dados estão próximos dos relatados na literatura, em que se observa que, em
442 cerca de 50% dos casos, a doença é diagnosticada em estágios avançados (III ou IV), o que
443 torna o tratamento mais agressivo e, conseqüentemente, com menor probabilidade de cura,
444 sobretudo nas localidades de difícil acesso, como é o caso do Amazonas (18).

445 Neste estudo, a população estudada apresentou idade média de média 48,4 (\pm SD
446 13,4), o que corrobora a literatura, que demonstra que a maioria dos cânceres de colo de
447 útero se desenvolve entre 45 e 55 anos (19). Entretanto, se observou que 14 (35,9%) das
448 pacientes estavam na faixa etária entre 21 e 40 anos, o que coincide com os resultados do
449 estudo de Moysés *et al.* (20) (2019), realizado em Manaus (AM), na Fundação Centro de
450 Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), que descreveu as variáveis sociodemográficas

451 e os fatores de risco para o CCU em 103 pacientes em tratamento e mostrou um perfil etário
452 entre 35 e 39 anos.

453 O baixo nível de escolaridade tem sido associado ao risco para o câncer de colo do
454 útero, o que sugere que essas mulheres podem não reconhecer a importância do exame
455 preventivo ou não ter o conhecimento necessário para buscar rastreamento e tratamento
456 (21). Estudo transversal realizado em 451 mulheres com 18 anos ou mais nos condados de
457 Isiolo e Tharaka Nithi, no leste do Quênia, demonstrou que 49,2% relataram não serem
458 alfabetizadas ou possuírem apenas o ensino primário (22). Essa situação também foi
459 encontrada em um estudo qualitativo realizado com 35 mulheres em idades entre 21 e 65
460 anos residentes em duas favelas urbanas em Lagos, na Nigéria, o qual mostrou que 60% das
461 participantes disseram ter apenas educação não formal ou ensino primário (23). No Brasil, em
462 um estudo prospectivo e observacional com 631 pacientes de 16 locais representativos das
463 cinco regiões brasileiras, também foi observado que a menor escolaridade foi associada à não
464 realização do exame para o câncer de colo do útero (24). Nesta pesquisa, 46,2% das mulheres
465 relataram serem analfabetas ou terem ensino fundamental incompleto, o que corrobora o
466 estudo realizado em Manaus, no Estado do Amazonas, com 103 pacientes em tratamento para
467 o CCU na FCECON, no qual foi observado que 27,2 % das pacientes eram analfabetas ou só
468 possuíam ensino fundamental incompleto (20). Ademais, o estudo de Lucena *et al.* (2011)(25)
469 realizado no município de Porto Velho, Estado de Rondônia, também Região Norte do País,
470 mostrou que 78 (34,3%) das mulheres eram analfabetas ou só possuíam ensino fundamental
471 incompleto, o que confirma o baixo grau de instrução dessa população. Esse cenário enfatiza
472 a importância de ações de saúde direcionadas às necessidades educacionais e sociais para a
473 Região Amazônica.

474 O rastreio das lesões precursoras do câncer de colo do útero é um desafio na Região
475 Amazônica, principalmente nos municípios do interior dos estados, pois as peculiaridades
476 geográficas promovem um isolamento, principalmente das mulheres que moram em
477 comunidades nas margens dos rios (ribeirinhas), fato que pode justificar os resultados desta
478 pesquisa, pois 48,7% das pacientes relataram serem naturais do interior do Estado.
479 Entretanto, ao serem abordadas sobre moradia nos últimos cinco anos, 64,1% reportaram
480 residir na capital, porém, em algumas situações em que foi necessário contato com a paciente,
481 houve dificuldades em encontrar alguns endereços. Situação semelhante foi observada por
482 Torres *et al.* (2021) (26) em estudo de mulheres com câncer cervical atendidas no hospital
483 oncológico de Manaus, em que a referência de residência também foi imprecisa, pois algumas
484 delas indicam endereço na zona urbana apesar de virem da zona rural ou de municípios do
485 interior do Amazonas. Nessa situação, pode-se considerar que essas pacientes não queiram
486 ser contactadas; às vezes pelo estigma da doença, pois o CCU atinge um órgão repleto de
487 simbolismo para a mulher, visto que envolve questões inerentes à sexualidade, à feminilidade
488 e à reprodução (27).

489 As pacientes da FCECON são em sua totalidade usuárias do SUS, portanto, quanto à
490 situação econômica da população estudada observou-se que 30 (77,0%) relataram não terem
491 renda ou a renda familiar ser de até um salário-mínimo (U\$286,00). Os dados desta pesquisa
492 são reforçados pelo estudo realizado por Tadesse (2015) (28) em mulheres com diagnóstico
493 de câncer do colo do útero atendidas em um hospital de referência na Etiópia com o objetivo
494 de avaliar diferentes fatores socioeconômicos e culturais relacionados às mulheres
495 vulneráveis ao câncer de colo do útero. Observou-se também que a maioria das participantes
496 78 (39,4%) eram donas de casa; e 73 (36,9%), agricultoras. Moysés *et al.* (2023) (29) em um

497 estudo envolvendo 119 mulheres em tratamento CCU, em um centro de referência para
498 tratamento do câncer em Manaus, observou que a maioria das mulheres (31,8%) não
499 trabalhava fora de casa e apresentava baixo nível socioeconômico. Esses dados reforçam que
500 a baixa condição socioeconômica possui uma influência significativa nas mulheres com câncer
501 de colo do útero e é fator para a não realização do exame de rastreio e para,
502 consequentemente, maior incidência da doença e maior mortalidade.

503 Está evidenciado que o início da vida sexual precoce aumenta o risco de desenvolver o
504 CCU, característica que é observada em países em desenvolvimento(30). Mekonnen e Mittiku
505 (2023) (31) conduziram um estudo de revisão sistemática e metanálise que revelou existir uma
506 associação entre o início da vida sexual precoce e o câncer do colo do útero, o que indica que
507 as mulheres que iniciaram a relação sexual antes dos 18 anos de idade tiveram um risco maior
508 de contrair o CCU do que as mulheres adultas. Rozario *et al.* (2019) (32) identificaram em um
509 estudo realizado com 1.004 mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma de células
510 escamosas que a faixa etária de início da atividade sexual foi entre 17 e 19, diferentemente
511 dos resultados encontrados no presente estudo, que foram de 31 (79,5%) pacientes que
512 tiveram a primeira relação sexual (sexarca) entre 12 e 17 anos. É importante destacar que no
513 Estado do Amazonas a geografia dos rios, sua extensão, a escassez e a limitação de recursos
514 em algumas regiões também propiciam vulnerabilidades que acabam por suscitar a
515 exploração/violência sexual de meninas e mulheres.

516 Atualmente, o método de rastreamento do câncer de colo do útero no Brasil,
517 disponível pelo Sistema Único de Saúde, é o exame citopatológico (exame de Papanicolaou),
518 que deve ser oferecido às mulheres na faixa etária de 25 a 64 anos e que já tiveram atividade
519 sexual. Esse exame deve ser realizado a cada três anos depois de dois exames consecutivos

520 normais, com intervalo de um ano(33). Entretanto, a eficácia do rastreamento por meio do
521 exame de Papanicolaou é em grande parte dependente da qualidade da amostra coletada e
522 da acurácia na interpretação (34–36). Neste estudo, 17 (48,6%) mulheres foram hiper-
523 rastreadas (mais de uma citologia a cada três anos), o que corrobora os estudos que mostram
524 a baixa sensibilidade do exame, com taxas de falsos negativos que variam entre 6% e 56% e
525 podem ocorrer nas fases pré-analítica e analítica (37,38). Os fatores de risco associados à baixa
526 sensibilidade e, conseqüentemente, ao aumento da taxa de resultados falsos-negativos não
527 são totalmente conhecidos. Apesar de esforços, o controle de qualidade do rastreamento
528 ainda é voltado para a análise laboratorial e pouco se direciona para a qualidade da coleta da
529 amostra(39). Nesse sentido, vários estudos de metanálise e análises agrupadas de ensaios
530 aleatorizados demonstraram que o rastreio com testes de HPV é superior ao rastreio por
531 citologia e, portanto, está se tornando cada vez mais recomendado (40–43). No Brasil, apesar
532 de os testes para detecção de HPV ainda não estarem incorporados no SUS, foram publicadas
533 recomendações com o objetivo de orientar os profissionais que trabalham em cenários nos
534 quais os testes estão disponíveis para que possam utilizá-los embasados em evidências e de
535 acordo com as melhores práticas. Em paralelo, vem sendo publicados estudos investigando a
536 mudança para a abordagem molecular no rastreamento do CCU no contexto brasileiro (44).
537 Dentre as vantagens do teste de HPV, é importante salientar que a coleta do material biológico
538 pode ser realizada pela própria mulher (autocoleta) sem comprometer a sensibilidade do
539 método (45). Isso facilitaria o acesso do exame às populações de localidades rurais e remotas,
540 o que é a realidade do Estado do Amazonas.

541 Embora exista um esforço para alcançar a melhor cobertura possível para a realização
542 do teste de Papanicolaou, muitas mulheres relatam não realizar esse exame e referem alguns

543 fatores para essa não adesão. Estudo realizado em Estocolmo, Suécia, em que foram incluídas
544 1.510 mulheres que frequentavam o programa de rastreio do CCU, 44% não aderiram (ou seja,
545 não compareceram à triagem no prazo de um ano após o convite inicial), 51% das quais
546 declararam dificuldades em se ausentar do trabalho(46). Neste estudo 59,1% das
547 mulheres relataram inibição, vergonha, medo ou falta de tempo, o que reforça os dados
548 encontrados no estudo de Silva *et al.* (2015) (47) realizado em uma Unidade Básica de Saúde
549 do município de Londrina-PR, Brasil, onde, dentre os determinantes de crenças e atitudes em
550 saúde, a vergonha (55,6%) foi o sentimento autorrelatado predominante. Outro estudo
551 realizado com 40 mulheres cadastradas em uma Estratégia de Saúde da Família, na cidade de
552 Messias Targino/RN, Brasil mostrou que 20 (50%) responderam que a vergonha é o principal
553 fator para não realizarem o exame (48). Outros estudos demonstraram que sentimentos de
554 medo, vergonha e constrangimento foram verbalizados pelas mulheres como impedimentos
555 para acessar a unidade de saúde e realizar o exame de Papanicolaou (27,49,50).

556 Mulheres que vivem com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)/síndrome da
557 imunodeficiência adquirida, particularmente com imunossupressão, são mais propensas a
558 contrair uma infecção persistente por HPV de alto risco que leve à displasia cervical ou ao
559 câncer cervical (51). No presente estudo, uma paciente foi detectada com infecção por HIV; e
560 sabe-se que mulheres vivendo com esse vírus são de quatro a cinco vezes mais propensas a
561 desenvolver o CCU, o que corrobora com Clifford *et al.* (2017) (52), que realizaram uma revisão
562 sistemática e metanálise da distribuição dos tipos de HPV de alto risco em 19.883 mulheres
563 HIV positivas e encontraram maior prevalência de HPV 16, HPV 18 e HPV 45 em mulheres com
564 cânceres cervicais invasivos. Bowden *et al.* (2023) (53) reforçam esse pressuposto com
565 evidências altamente sugestivas de que a positividade do HIV reduz a eliminação do HPV de

566 alto risco. Na cidade de Belém, Pará, Brasil, um estudo realizado com 169 mulheres infectadas
567 pelo HIV mostrou que a prevalência da infecção pelo HPV foi de 63,3%. Das 47 amostras
568 genotipadas, 40,4% foram positivas para HPV de alto risco 16; e 12,8%, para HPV de alto risco
569 52 (54). Ademais, essas pacientes podem apresentar uma resposta não satisfatória aos
570 tratamentos cirúrgico, radiológico ou quimioterápico (55–57).

571 Nesse estudo, o tipo histológico mais frequentemente observado foi o carcinoma de
572 células escamosas (CEC) (89,7%), seguido do adenocarcinoma (ADC) (10,3%); já os achados do
573 presente estudo corroboram aquele realizado por de Sanjose *et al.* (2010) (58) que analisaram
574 amostras parafinadas de câncer de colo do útero provenientes de 38 países com positividade
575 para o HPV e identificaram que 87% eram CEC. No Brasil, em um estudo de coorte realizado
576 por meio da revisão dos prontuários físicos e eletrônicos e dos laudos histopatológicos de
577 mulheres com diagnóstico primário de câncer de colo do útero, o tipo histológico mais
578 frequente foi o CEC (83,9% dos casos) (32) Em estudo realizado em dois hospitais oncológicos
579 de referência no Estado de São Paulo, Brasil – o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
580 (ICESP) e o Hospital de Câncer de Barretos – envolvendo 172 amostras de pacientes com
581 diagnóstico de câncer de colo do útero, a avaliação histológica foi de 83,7% para CEC; e de
582 16,3% para adenocarcinoma (59). Outro estudo realizado na Unidade de Assistência de Alta
583 Complexidade (UNACON) do Hospital Estadual do Câncer do Maranhão- Brasil, e no Centro de
584 Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), com 120 mulheres diagnosticadas
585 com câncer de colo de útero, também identificou um percentual de CEC (79,1%) (60).

586 Tendo em vista que, segundo dados do INCA (2022) (61), cerca de 35% dos casos de
587 câncer de colo do útero são diagnosticados em fase avançada (III e IV) e que há um gradiente
588 entre estadiamento, prognóstico clínico e tratamento das mulheres, há de se refletir acerca

589 dos fatores que influem nesse resultado. Na presente pesquisa também se encontrou o maior
590 percentual 23,1% (9/39) de mulheres com estágio mais avançado, IIC1. Quanto ao
591 tratamento, a terapêutica mais frequente foi quimioterapia associada à radioterapia (74,4%).
592 Esse resultado pode ser explicado devido aos fatores sociodemográficos e econômicos (baixa
593 renda, residência em outras cidades) que implicam na dificuldade de acesso aos serviços de
594 saúde na capital amazonense, o que as leva a buscarem atendimento somente quando a
595 doença já se encontra em estágio avançado. Isso torna o tratamento mais agressivo e,
596 consequentemente, com menor probabilidade de cura (10,62).

597 Uma situação encontrada nesta pesquisa foi que três (7,7%) pacientes não realizaram
598 tratamento, e os motivos relatados foram: indicação direta de tratamento paliativo, sem
599 condições financeiras para transporte até a FCECON e decisão de voltar para o seu município.
600 Ratifica-se que um dos obstáculos que dificultam o acesso às informações sobre o câncer de
601 colo do útero é o baixo nível socioeconômico, pois pessoas com menos poder aquisitivo têm
602 maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde e consequentemente menor acesso a
603 informações fidedignas sobre a doença – isso tanto na atenção básica quanto na alta
604 complexidade (63). A paciente desprovida de informação não entende a importância e o
605 objetivo da terapia antineoplásica e opta por desistir do tratamento sem compreender o
606 prejuízo que pode sofrer em decorrência dessa decisão. Ademais, essa mulher muitas vezes é
607 abandonada pelo parceiro, amigos(as) ou familiar(es); e essa situação de vulnerabilidade a
608 torna deprimida, sem perspectiva de amparo emocional no seu cenário de maior fragilidade.

609 Foi verificado, neste estudo, que o cf-DNA HPV 16 em amostras de plasma
610 foi detectado em 21 das 39 (53,8%) mulheres no momento do diagnóstico da doença, mas o
611 genótipo 18 não foi observado em nenhuma das pacientes. Estes dados reafirmam os

612 encontrados em outros estudos que analisaram a presença de cf-DNA HPV no plasma pré-
613 tratamento por tipo de HPV e encontraram uma prevalência menor do genótipo 18. Em um
614 estudo semelhante foi encontrada no plasma a taxa de detecção para HPV 18 de 52,9%; e para
615 o genótipo 16 de 57,1%, porém a detecção do cf-DNA HPV tanto no plasma quanto no soro de
616 pacientes com câncer descrita em trabalhos anteriores varia de 7 a 70% (64–66). Estudos
617 pretéritos usaram um número amostral diferente, assim como populações, materiais (soro ou
618 plasma) e diferentes métodos de extração do DNA; dessa forma, as taxas de detecção do cDNA
619 HPV, seja no soro, seja no plasma, ficam um pouco limitadas para comparações (67,68).

620 Uma revisão sistemática que incluiu nove estudos revelou que 62%–89% das
621 recidivas/persistências da doença foram detectadas no prazo de dois anos em mulheres após
622 o tratamento primário para o CCU; e seis estudos relataram que 89% foram detectadas em
623 cinco anos (69). Esse fato também é confirmado por Mahantshetty *et al.* (2018) (67) em
624 estudo prospectivo, realizado com 135 pacientes com CCU, em que a resposta clínica
625 completa foi observada em 117 mulheres (86,6%), resposta parcial em 12 (9%) e doença em
626 seis (4,4%), após nove meses do tratamento, no acompanhamento de 60 meses; 56 (41,5%)
627 mulheres tiveram persistência/recidiva. Na presente pesquisa a recidiva/persistência
628 de uma paciente foi detectada em 33 meses (dois anos e nove meses) após o tratamento, e
629 de outras em 23 meses (um ano e 11 meses) após tratamento. Contudo o acompanhamento
630 delineado para o presente estudo foi de até 18 meses. Assim, para alguns casos, não foi
631 realizada a detecção do cf-DNA HPV em pontos chaves do tempo de seguimento, prejudicando
632 a análise prévia de possíveis recidivas/persistência da doença.

633 Cervena *et al.* (2019) (4) em uma revisão sistemática, revelaram as últimas descobertas
634 sobre o cfDNA em muitos tipos de câncer e mostraram a possibilidade de usá-lo como

635 biomarcador para prever a resposta a certas terapias e para detectar persistência/recidiva do
636 câncer de forma minimamente invasiva. Essas informações respaldam o que foi encontrado
637 nesta pesquisa, pois o cf-DNA HPV no plasma em uma paciente foi detectado nove meses antes
638 do diagnóstico de recidiva/persistência da doença. Esse episódio também foi observado
639 em outra paciente uma vez que o cf-DNA HPV no plasma foi detectado seis meses antes do
640 diagnóstico de recidiva/persistência da doença. O achado deste trabalho corrobora o
641 estudo conduzido por Mittelstadt *et al.* (2023)(70) envolvendo 35 pacientes com CCU, virgens
642 de tratamento em estágio inicial e avançado, que mostrou que o cf-DNA HPV foi detectado em
643 22 (85%) mulheres, o que reforça o seu potencial como biomarcador para monitoramento
644 terapêutico em pacientes com CCU.

645 O teste de cf-DNA HPV pode ser útil como método de detecção de recidiva/persistência
646 após radioterapia em pacientes com CCU (69,71). Em um estudo de metanálise que incluiu
647 dez estudos prospectivos de coorte publicados nas últimas duas décadas, foi avaliado o papel
648 do teste de cf-DNA HPV para detectar recidiva/persistência precoce entre 1.055 mulheres com
649 CCU que receberam radiação; e observou-se que os casos positivos para o cf-DNA HPV
650 apresentaram três vezes mais chance de recidiva/persistência (11). Esse fato foi presenciado
651 no presente estudo, pois observou-se paciente que apresentou intercorrência clínica durante
652 a quimioterapia, não tendo sido essa etapa do procedimento concluída e tendo sido
653 completado somente o tratamento de radioterapia. Observou-se que houve redução da carga
654 viral pós-radioterapia, seguida de uma elevação da carga; a paciente apresentou
655 recidiva/persistência da doença e foi a óbito.

656 Bonlokke *et al.* (2023) (72)conduziram um estudo para investigar o valor diagnóstico
657 do DNA circulante do HPV 16 e 18 em pacientes com CCU e identificaram que a quantidade

658 de cf-DNA HPV está intimamente relacionada a diferentes parâmetros clínicos como estágio da
659 doença e tamanho do tumor. No entanto, para pacientes com menor carga de doença, a
660 positividade do cf-DNA HPV é significativamente menor, ou seja, é necessária uma
661 certa carga de doença para que o cf-DNA HPV seja detectado ou mesmo para que esteja
662 presente na circulação sanguínea. Por outro lado, um estudo de metanálise foi realizado para
663 avaliar as aplicações do cf-DNA HPV como biomarcador no câncer cervical abordando a sua
664 precisão; e foi relatado que a maioria dos estudos empregou o método qPCR, que demonstrou
665 especificidade relativamente alta, mas baixa sensibilidade, pois com qPCR é difícil detectar
666 quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos circulantes no sangue (5). Nesse sentido, a
667 reação em cadeia da polimerase digital (dPCR) fornece uma nova técnica para diagnóstico
668 molecular, com vantagens superiores, como maior sensibilidade, precisão e especificidade em
669 relação ao método qPCR de sorte que, se disponível, pode ser utilizada nesses casos (73).

670 Em estudo realizado em mulheres com diagnóstico de CCU, identificou-se que as
671 pacientes que foram positivas para o cf-DNA HPV no plasma tiveram menor tempo de sobrevida
672 global, em anos, em relação às que foram negativas, tendo como média do tempo de
673 sobrevida no total de 4,5 anos (3,9-5,2 anos), sendo de 2,6 anos (2,2-3,1 anos) para as
674 positivas; e de 6,0 anos (5,3-6,8) para as negativas (68). Na presente pesquisa, as mulheres
675 consideradas detectáveis ao cf-DNA HPV no plasma também tiveram tendência a sobreviver
676 menos tempo do que as mulheres não detectáveis. Contudo, a amostragem deste estudo foi
677 pequena, e o tempo de seguimento variou entre seis e 18 meses e pode ter sido insuficiente
678 para avaliação da sobrevida.

679 A disponibilidade e a qualidade dos serviços de saúde influenciam diretamente a
680 sobrevida das pacientes, que é aumentada ou diminuída conforme o acesso aos serviços de

681 saúde, a existência de programas de rastreamento, a eficácia das intervenções e a
682 disponibilidade de meios diagnósticos e de tratamento (74). Em 2011, o Tribunal de Contas da
683 União do Brasil (TCU) divulgou relatório técnico baseado nos dados do Sistema de Informações
684 Ambulatoriais (SIA) e nos Registros Hospitalares de Câncer (RHC) indicando que os
685 tratamentos oncológicos providos pelo SUS não ocorriam no tempo adequado. Com o objetivo
686 de estabelecer prazos que garantam o tratamento dos pacientes diagnosticados com câncer
687 em momento oportuno, foi publicada a Lei Federal n.º 12.732/2012 fixando prazo de até 60
688 dias, contados a partir da data da confirmação do diagnóstico em laudo patológico ou em
689 prazo menor, para que o paciente com neoplasia maligna inicie o tratamento no SUS (75).
690 Nesse estudo, o cálculo do tempo foi realizado considerando a data da primeira consulta na
691 FCECON e o início do tratamento das 36 mulheres em seguimento terapêutico. A maioria das
692 pacientes obtiveram um ΔT entre 5,1 e 7 meses (30,6%). Uma paciente iniciou o tratamento
693 um mês após chegar à FCECON; por outro lado, uma paciente esperou 29 meses para cirurgia,
694 e esse período coincidiu com a pandemia de SARS-CoV-2. A demora no início do tratamento
695 se deve à grande demanda do hospital apesar da “Lei dos 60 dias”. Ainda não existem
696 mecanismos que assegurem o cumprimento dessa legislação; comumente, as mulheres
697 acometidas por CCU, usuárias do SUS, relatam itinerários muito longos e difíceis para
698 acesso ao tratamento oncológico em tempo oportuno, o que evidencia a necessidade de
699 ampliação do acesso aos serviços de tratamento oncológico no Estado, em especial para as
700 mulheres que apresentam pior situação.

701 **Limitations of the study**

702 A pandemia de SARS-CoV-2 dificultou o acesso das mulheres à FCECON e comprometeu a
703 amostragem e a continuidade das coletas das amostras biológicas nas etapas previstas. Dessa

704 forma, a análise completa das quatro fases ficou comprometida, portanto o tamanho amostral
705 limita as análises. Além disso, a consulta de informações e a interpretação dos prontuários das
706 pacientes para observar presença de recidiva/persistência da doença eram limitadas pelos
707 registros realizados pela equipe assistencial; e nem todas as informações estavam
708 disponíveis. Ademais, o tempo estudado variou de seis a 18 meses, o que pode ter comprometido
709 a análise de sobrevida.

710 **Conclusions**

711 A detecção de cf-DNA HPV em pacientes com câncer de colo do útero, após tratamento, mostra
712 uma tendência ao desenvolvimento de recidiva/persistência da doença.

713 O cf-DNA HPV no plasma na fase zero (antes do tratamento) foi detectado em 53,8% das
714 pacientes diagnosticadas com câncer de colo do útero. Foi possível detectar o cf-DNA HPV
715 no plasma seis meses antes do diagnóstico clínico da recidiva/persistência da doença ser
716 caracterizada. Foi possível observar uma tendência que mostra que mulheres que
717 apresentaram o cf-DNA HPV no plasma apresentaram menor sobrevida.

718 **Acknowledgments**

719 Agradecemos à Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON)
720 pelo apoio e pela infraestrutura; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
721 (FAPEAM) por meio do Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS) do
722 Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC) e do Programa de Apoio à Consolidação das
723 Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO) pelo suporte financeiro. Os
724 autores também agradecem as pacientes que participaram deste estudo.

725

726 **Conflicts of interests**

727 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

728

729

References

- 730 1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer
731 Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185
732 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
- 733 2. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). World Cancer
734 Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Wild CP WESB, editor. Vol. 199, Cancer Control.
735 IARC; 2020. 477 p.
- 736 3. INCA. DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DO COLO DO ÚTERO Relatório Anual 2022 Acesse :
737 www.inca.gov.br/utero Rio de Janeiro. 2022;28.
- 738 4. Cervena K, Vodicka P, Vymetalkova V. Diagnostic and prognostic impact of cell-free DNA in
739 human cancers: Systematic review. Vol. 781, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*.
740 2019.
- 741 5. Gu Y, Wan C, Qiu J, Cui Y, Jiang T, Zhuang Z. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable
742 biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(2).
- 743 6. Gu Y, Wan C, Qiu J, Cui Y, Jiang T, Zhuang Z. Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable
744 biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(2). Available from:
745 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224001>
- 746 7. Sousa GA de, Viana JN, Souza C da SM, Moysés RPC. Linha de Cuidado do Câncer do Colo do
747 Útero no Amazonas: uma Análise da Prevenção ao Tratamento de Lesões Precursoras. *Revista*
748 *Brasileira de Cancerologia*. 2021;67(3).
- 749 8. Hull R, Mbele M, Makhafola T, Hicks C, Wang SM, Reis RM, et al. Cervical cancer in low and
750 middle-income countries. *Oncol Lett* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Dec 28];20(3):2058.
751 Available from: [/pmc/articles/PMC7400218/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34400218/)
- 752 9. Garnelo L, Sousa ABL, Da Silva CDO. Health regionalization in Amazonas: Progress and
753 challenges. *Ciencia e Saude Coletiva*. 2017;22(4).
- 754 10. Viana JN, Moysés RPC, Espir TT, De Sousa GA, Barcellos JFM, Da Graça Pereira Alves M. Social
755 determinants of health and secondary prevention of cervical cancer in the State of Amazonas,
756 Brazil. *Medicina (Brazil)*. 2019;52(2).
- 757 11. Sabeena S, Kuriakose S, Damodaran B, Ravishankar N, Arunkumar G. Human papillomavirus
758 (HPV) DNA detection in uterine cervix cancer after radiation indicating recurrence: A systematic
759 review and meta-analysis. *J Gynecol Oncol*. 2020;31(2).
- 760 12. Veo CAR, Saad SS, Fregnani JHTG, Scapulatempo-Neto C, Tsunoda AT, Resende JCP, et al.
761 Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and
762 anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. *Tumor Biology*. 2015 Jul;36(7):5399–405.
- 763 13. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines:
764 Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*.
765 2009;55(4).

- 766 14. Al-Azri MH. Delay in cancer diagnosis: Causes and possible solutions. Vol. 31, Oman Medical
767 Journal. 2016.
- 768 15. Hanna TP, King WD, Thibodeau S, Jalink M, Paulin GA, Harvey-Jones E, et al. Mortality due to
769 cancer treatment delay: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020;371.
- 770 16. de Oliveira HM, Gonçalves MJF, Pires ROM. Characterization of the family health strategy in
771 Amazonas State, Brazil: An analysis of implementation and impact. *Cad Saude Publica*. 2011;27(1).
- 772 17. Roberto Nunes Guedes Secretário Especial de Fazenda Waldery Rodrigues Junior P, Susana
773 Cordeiro Guerra Diretor-Executivo Fernando José de Araújo Abrantes P, Luiz Rios Neto EG, Renato
774 Pereira Cotovio C, Maria Ferreira M, Lucia França Pontes Vieira Presidente da República Jair
775 Messias Bolsonaro M, et al. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE.
- 776 18. Thuler LCS, Bergmann A, Casado L. Perfil das Pacientes com Câncer do Colo do Útero no
777 Brasil, 2000-2009: Estudo de Base Secundária. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2012;58(3).
- 778 19. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of
779 incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*. 2020
780 Feb;8(2):e191–203.
- 781 20. Moysés RPC, Amaral G de S, Nascimento JV, Santos BD, Pereira M da G. MULHERES
782 AMAZÔNICAS COM CÂNCER DE COLO DE ÚTERO: PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO E FATORES DE
783 RISCO. In: Bases conceituais da saúde 8. 2019.
- 784 21. Musa J, Achenbach CJ, O'Dwyer LC, Evans CT, McHugh M, Hou L, et al. Effect of cervical
785 cancer education and provider recommendation for screening on screening rates: A systematic
786 review and meta-analysis. *PLoS One [Internet]*. 2017 Sep 1 [cited 2023 Dec 27];12(9). Available
787 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28873092/>
- 788 22. Gatumo M, Gacheri S, Sayed AR, Scheibe A. Women's knowledge and attitudes related to
789 cervical cancer and cervical cancer screening in Isiolo and Tharaka Nithi counties, Kenya: A cross-
790 sectional study. *BMC Cancer*. 2018;18(1).
- 791 23. Olubodun T, Balogun MR, Odeyemi AK, Odukoya OO, Ogunyemi AO, Kanma-Okafor OJ, et al.
792 Barriers and recommendations for a cervical cancer screening program among women in low-
793 resource settings in Lagos Nigeria: a qualitative study. *BMC Public Health*. 2022;22(1).
- 794 24. A.N. R, A.C. DM, A. C, E. C, K.L. T, F. D, et al. Social disparities and patients' attitudes are
795 associated with lower rates of cervical cancer screening in Brazil: Results of EVITA study (LACOG
796 0215). *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15 Supplement 1).
- 797 25. Lucena LT de, Zãn DG, Crispim P di TB, Ferrari JO. Fatores que influenciam a realização do
798 exame preventivo do câncer cérvico-uterino em Porto Velho, Estado de Rondônia, Brasil. *Rev
799 Panamazonica Saude*. 2011;2(2).
- 800 26. Torres KL, de Melo Farah Rondon HH, Martins TR, Martins S, Ribeiro A, Raiol T, et al. Moving
801 towards a strategy to accelerate cervical cancer elimination in a high-burden city—Lessons
802 learned from the Amazon city of Manaus, Brazil. *PLoS One [Internet]*. 2021 Oct 1 [cited 2023 Dec
803 27];16(10):e0258539. Available from:
804 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0258539>

- 805 27. Santos JN dos, Gomes RS. Sentidos e Percepções das Mulheres acerca das Práticas
806 Preventivas do Câncer do Colo do Útero: Revisão Integrativa da Literatura. *Revista Brasileira de*
807 *Cancerologia*. 2022;68(2).
- 808 28. Tadesse SK. Socio-economic and cultural vulnerabilities to cervical cancer and challenges
809 faced by patients attending care at Tikur Anbessa Hospital: A cross sectional and qualitative study.
810 *BMC Womens Health* [Internet]. 2015 Sep 16 [cited 2023 Dec 27];15(1):1–12. Available from:
811 <https://bmcwomenshealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12905-015-0231-0>
- 812 29. Moysés R, Marques I, Santos BD, Benzaken A, Pereira MG. Quality of Life in Amazonian
813 Women during Cervical Cancer Treatment: The Moderating Role of Spirituality. *International*
814 *Journal of Environmental Research and Public Health* 2023, Vol 20, Page 2487 [Internet]. 2023 Jan
815 30 [cited 2023 Dec 27];20(3):2487. Available from: [https://www.mdpi.com/1660-](https://www.mdpi.com/1660-4601/20/3/2487/htm)
816 [4601/20/3/2487/htm](https://www.mdpi.com/1660-4601/20/3/2487/htm)
- 817 30. Shrestha AD, Neupane D, Vedsted P, Kallestrup P. Cervical cancer prevalence, incidence and
818 mortality in low and middle income countries: A systematic review. Vol. 19, *Asian Pacific Journal*
819 *of Cancer Prevention*. 2018. p. 319–24.
- 820 31. Gonie Mekonnen AI, Moges Mittiku Y. Early-onset of sexual activity as a potential risk of
821 cervical cancer in Africa: A review of literature. *PLOS Global Public Health* [Internet]. 2023 Mar 22
822 [cited 2023 Dec 27];3(3):e0000941. Available from:
823 <https://journals.plos.org/globalpublichealth/article?id=10.1371/journal.pgph.0000941>
- 824 32. Rozario S do, Silva IF da, Koifman RJ, Silva IF da. Characterization of women with cervical
825 cancer assisted at Inca by histological type. *Rev Saude Publica*. 2019;53:88.
- 826 33. INCA. Diretrizes Brasileiras para o rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero. Vol. XXXIII,
827 Ministério Da Saúde. 2016.
- 828 34. Shingleton HM, Patrick RL, Johnston WW, Smith RA. The current status of the Papanicolaou
829 smear. *CA Cancer J Clin*. 1995;45(5).
- 830 35. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki AB, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer
831 Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *CA Cancer J Clin*.
832 2002;52(6).
- 833 36. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the
834 papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: A systematic
835 review. *Ann Intern Med*. 2000;132(10).
- 836 37. Silva Santos MJ, Alves Ribeiro A. Estratégias Utilizadas para Melhorar a Qualidade dos Exames
837 Citopatológicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2020;66(1).
- 838 38. Morais LSF, Plewka J, Amaral RG. Avaliação dos indicadores de qualidade dos exames
839 citopatológicos do colo do útero realizados em um município do Paraná , Brasil. *J Bras Patol Med*
840 *Lab*. 2020;56(1).
- 841 39. Erratum: 2012 Updated consensus guidelines for the management of abnormal cervical
842 cancer screening tests and cancer precursors (*Journal of Lower Genital Tract Disease* (2013) 17
843 (S1-S27)). Vol. 17, *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2013.
- 844 40. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Chris CJL, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human
845 papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. Vol. 30, *Vaccine*. 2012.

- 846 41. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJF, Arbyn M, et al. Efficacy of HPV-based
847 screening for prevention of invasive cervical cancer: Follow-up of four European randomised
848 controlled trials. *The Lancet*. 2014;383(9916).
- 849 42. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer
850 screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and
851 current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(3).
- 852 43. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. European guidelines
853 for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening
854 and vaccination. Vol. 1, *Papillomavirus Research*. 2015.
- 855 44. BRASIL. [https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2024/marco/prevencao-de-](https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2024/marco/prevencao-de-cancer-de-colo-de-utero-ministerio-da-saude-incorpora-teste-inovador-para-deteccao-do-hpv-em-mulheres)
856 [cancer-de-colo-de-utero-ministerio-da-saude-incorpora-teste-inovador-para-deteccao-do-hpv-](https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2024/marco/prevencao-de-cancer-de-colo-de-utero-ministerio-da-saude-incorpora-teste-inovador-para-deteccao-do-hpv-em-mulheres)
857 [em-mulheres](https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2024/marco/prevencao-de-cancer-de-colo-de-utero-ministerio-da-saude-incorpora-teste-inovador-para-deteccao-do-hpv-em-mulheres).
- 858 45. Arbyn M, Castle PE, Schiffman M, Wentzensen N, Heckman-Stoddard B, Sahasrabudhe V V.
859 Meta-analysis of agreement/concordance statistics in studies comparing self- vs clinician-
860 collected samples for HPV testing in cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2022;151(2).
- 861 46. Östensson E, Alder S, Elfström KM, Sundström K, Zethraeus N, Arbyn M, et al. Barriers to and
862 facilitators of compliance with clinic-based cervical cancer screening: Population-based cohort
863 study of women aged 23-60 years. *PLoS One*. 2015;10(5).
- 864 47. Silva MA dos S, Teixeira ÉMB, Ferrari RAP, Cestari MEW, Cardelli AAM. Fatores relacionados a
865 não adesão à realização do exame de Papanicolaou TT - Factors related to non-adherence to the
866 realization of the Papanicolaou test. *Rev RENE*. 2015;16(4).
- 867 48. Dantas PVJ, Leite KNS, César ESR, Silva S da CR, Souza TA, Nascimento BB. Conhecimento das
868 mulheres e fatores da não adesão acerca do exame papanicolaou. *Rev enferm UFPE on line*.
869 2018;12(3).
- 870 49. Aguilar RP, Soares DA. Barreiras à realização do exame Papanicolaou: perspectivas de usuárias
871 e profissionais da Estratégia de Saúde da Família da cidade de Vitória da Conquista-BA. *Physis:*
872 *Revista de Saúde Coletiva*. 2015;25(2).
- 873 50. Roque A de V, Lima ES de, Lopes G de S. A influência dos fatores psicossociais na prevenção
874 do câncer do colo de útero / The influence of psychosocial factors on cervical cancer prevention.
875 *Brazilian Journal of Development*. 2022;8(5).
- 876 51. Korn AK, Muzingwani L, O'Bryan G, Ensminger A, Boylan AD, Kafidi EL, et al. Cervical cancer
877 screening and treatment, HIV infection, and age: Program implementation in seven regions of
878 Namibia. *PLoS One*. 2022;17(2 February).
- 879 52. Clifford GM, Tully S, Franceschi S. Carcinogenicity of Human Papillomavirus (HPV) Types in
880 HIV-Positive Women: A Meta-Analysis From HPV Infection to Cervical Cancer. *Clin Infect Dis*
881 [Internet]. 2017 May 5 [cited 2023 Dec 26];64(9):1228. Available from:
882 [/pmc/articles/PMC5399941/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35399941/)
- 883 53. Bowden SJ, Doulgieraki T, Bouras E, Markozannes G, Athanasiou A, Grout-Smith H, et al. Risk
884 factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer:
885 an umbrella review and follow-up Mendelian randomisation studies. *BMC Med*. 2023;21(1).

- 886 54. Monteiro JC, Fonseca RR de S, Ferreira TC de S, Rodrigues LLS, da Silva ARB, Gomes ST, et al.
887 Prevalence of High Risk HPV in HIV-Infected Women From Belém, Pará, Amazon Region of Brazil:
888 A Cross-Sectional Study. *Front Public Health*. 2021;9.
- 889 55. Castle PE, Einstein MH, Sahasrabudde V V. Cervical cancer prevention and control in women
890 living with human immunodeficiency virus. *Ca [Internet]*. 2021 Nov [cited 2023 Dec 26];71(6):505.
891 Available from: [/pmc/articles/PMC10054840/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39844440/)
- 892 56. Marima R, Hull R, Lolas G, Syrigos KN, Kgoebane-Maseko M, Kaufmann AM, et al. The
893 Catastrophic HPV/HIV Dual Viral Oncogenomics in Concert with Dysregulated Alternative Splicing
894 in Cervical Cancer. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2021 Sep 1 [cited 2023 Dec 27];22(18). Available from:
895 [/pmc/articles/PMC8472041/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39844440/)
- 896 57. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Ibrahim Khalil A, Baussano I, Shah ASV, et al. Estimates of the
897 global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob Health [Internet]*. 2021 Feb 1
898 [cited 2023 Dec 27];9(2):e161–9. Available from:
899 <http://www.thelancet.com/article/S2214109X20304599/fulltext>
- 900 58. de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human
901 papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional
902 worldwide study. *Lancet Oncol [Internet]*. 2010 Nov [cited 2023 Dec 26];11(11):1048–56.
903 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20952254/>
- 904 59. de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus
905 genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer [Internet]*.
906 2013 Jul 24 [cited 2023 Dec 26];13(1):1–8. Available from:
907 <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-357>
- 908 60. Da Silva RL, Da Silva Batista Z, Bastos GR, Cunha APA, Figueiredo FV, De Castro LO, et al. Role
909 of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. *BMC Womens
910 Health [Internet]*. 2020 Aug 1 [cited 2023 Dec 26];20(1):1–11. Available from:
911 <https://bmcmwomenshealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12905-020-01035-0>
- 912 61. Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C.
913 Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*.
914 2023;69(1).
- 915 62. Garnelo L, Parente RCP, Puchiarelli MLR, Correia PC, Torres MV, Herkrath FJ. Barriers to
916 access and organization of primary health care services for rural riverside populations in the
917 Amazon. *Int J Equity Health*. 2020;19(1).
- 918 63. Lopes VAS, Ribeiro JM. Fatores limitadores e facilitadores para o controle do câncer de colo
919 de útero: uma revisão de literatura. *Cien Saude Colet*. 2019;24(9).
- 920 64. Shimada T, Yamaguchi N, Nishida N, Yamasaki K, Miura K, Katamine S, et al. Human
921 papillomavirus DNA in plasma of patients with HPV16 DNA-positive uterine cervical cancer. *Jpn J
922 Clin Oncol*. 2010;40(5):420–4.
- 923 65. Jaberipour M, Samsami A, Sahraiiian F, Kazerooni T, Hashemi M, Ghaderi A, et al. Elevation of
924 HPV-18 and HPV-16 DNA in the plasma of patients with advanced cervical cancer. *Asian Pacific
925 Journal of Cancer Prevention*. 2011;12(1).

- 926 66. Ho CM, Yang SS, Chien TY, Huang SH, Jeng CJ, Chang SF. Detection and quantitation of human
927 papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients.
928 *Gynecol Oncol.* 2005;99(3).
- 929 67. Mahantshetty U, Teni T, Naga P, Hotwani C, Umesh S, Kannan S, et al. Impact of HPV 16/18
930 infection on clinical outcomes in locally advanced cervical cancers treated with radical radio
931 (chemo) therapy - A prospective observational study. *Gynecol Oncol.* 2018;148(2).
- 932 68. Centrone CC. Detecção de DNA de HPV no plasma para potencial identificação precoce de
933 recidiva de câncer do colo do útero. [São Paulo]: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo;
934 2015.
- 935 69. Elit L, Kennedy EB, Fyles A, Metser U. Follow-up for cervical cancer: A program in evidence-
936 based care systematic review and clinical practice guideline update. *Current Oncology* [Internet].
937 2016 Apr 1 [cited 2023 Apr 30];23(2):109–18. Available from: /pmc/articles/PMC4835009/
- 938 70. Mittelstadt S, Kelemen O, Admard J, Gschwind A, Koch A, Wörz S, et al. Detection of
939 circulating cell-free HPV DNA of 13 HPV types for patients with cervical cancer as potential
940 biomarker to monitor therapy response and to detect relapse. *Br J Cancer.* 2023;128(11).
- 941 71. Cabel L, Bonneau C, Bernard-Tessier A, Héquet D, Tran-Perennou C, Bataillon G, et al. HPV
942 ctDNA detection of high-risk HPV types during chemoradiotherapy for locally advanced cervical
943 cancer. *ESMO Open.* 2021;6(3).
- 944 72. Bønløkke S, Steiniche T, Sorensen BS, Nyvang G, Lindegaard JC, Blaakær J, et al. Circulating
945 cell-free HPV DNA is a strong marker for disease severity in cervical cancer. *Mol Oncol.* 2023 Nov;
- 946 73. Tan LL, Loganathan N, Agarwalla S, Yang C, Yuan W, Zeng J, et al. Current commercial dPCR
947 platforms: technology and market review. Vol. 43, *Critical Reviews in Biotechnology.* 2023.
- 948 74. Santos R de S, Melo ECP. Mortalidade e assistência oncológica no Rio de Janeiro: câncer de
949 mama e colo uterino. *Escola Anna Nery.* 2011;15(2).
- 950 75. BRASIL. Tribunal de Contas da União. Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas do
951 Governo. Relatório de auditoria operacional na Política Nacional de Atenção Oncológica. Brasília.
952 2011;2009–10. Available from: [https://portal.tcu.gov.br/biblioteca-digital/auditoria-operacional-
953 na-politica-nacional-de-atencao-oncologica.htm](https://portal.tcu.gov.br/biblioteca-digital/auditoria-operacional-na-politica-nacional-de-atencao-oncologica.htm)
- 954