

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



“Lesões precursoras do câncer cervical: positividade para o Papilomavírus Humano e falha do tratamento em uma coorte hospitalar de mulheres tratadas num centro de referência do Rio de Janeiro, Brasil”

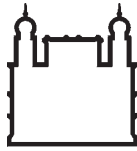
por

Vanessa Wallerstein Mignone Dantas

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

*Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Ilce Ferreira da Silva
Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosalina Jorge Koifman*

Rio de Janeiro, maio de 2013.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Lesões precursoras do câncer cervical: positividade para o Papilomavírus Humano e falha do tratamento em uma coorte hospitalar de mulheres tratadas num centro de referência do Rio de Janeiro, Brasil”

apresentada por

Vanessa Wallerstein Mignone Dantas

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Michelle de Oliveira e Silva

Prof.^a Dr.^a Carmen Freire Warden

Prof.^a Dr.^a Ilce Ferreira da Silva – Orientadora principal

Dissertação defendida e aprovada em 29 de maio de 2013.

E não importa se voltamos,
quando a maioria está indo.
Se olhamos as árvores,
enquanto a maioria olha os carros.
Se choramos, quando a maioria ri.
Ou se perguntamos, enquanto a maioria responde.
As diferenças são nossa maior semelhança!

Ana Margarida Mignone

Agradecimentos

À minha mãe, Ana Margarida, por tudo que sou hoje. Por me ensinar com palavras e atitudes todos os valores que tenho e acredito. Por todo o cuidado e respeito que sempre teve por mim e me ensinou a ter pelos outros. Além de ser minha base, meu eixo, meu porto seguro...muito obrigada mãe!

À minha irmã, Vivi, por nossos 25 anos de amizade e companheirismo. Pelas nossas crises de riso e pelo esforço para responder minhas infinitas perguntas. Por todo o suporte que sempre me dá e por acreditar tanto em mim, assim como eu acredito em você!

Às minhas tias, Márcia e Cris, minhas avós, Teté e Nize e meu pai, Antônio, por estarem sempre por perto acompanhando e torcendo pelas minhas conquistas.

A todos os meus amigos por serem meu equilíbrio, minha sanidade mental! Por compreenderem (às vezes, nem tanto) minha ausência em momentos corridos e estarem sempre ao meu lado!

A eles, Noraide, Arnaldo e Hannah, que me acompanham a vida inteira com muito amor, que me conhecem desde sempre, que torcem e comemoram comigo cada vitória! A eles que chamo de família por escolha, que encontro por prazer e que torço também a cada dia! Obrigada por TUDO e por fazerem parte de toda minha formação!

Ao meu namorado, Leo, por todo o apoio nesse final do mestrado, me incentivando e me obrigando a ir para a biblioteca do IMPA aos sábados e domingos de manhã!

À minha companheira de laboratório Sabrina, pelos nossos excelentes 6 anos de convivência e gargalhadas, dentro e fora do laboratório. Por toda ajuda e suporte que tive durante esses anos, e por sempre aturar e responder minhas perguntas. Você foi fundamental para minha formação como bióloga e como pessoa, obrigada!

À Camila e à Michelle pela enorme contribuição nesse trabalho e por estarem sempre dispostas a ajudar a resolver os muitos problemas que aparecem entre bancadas, pipetas, eletroferogramas e fotodocumentadores!

À minha orientadora Ilce, por me aceitar lá na iniciação científica, acreditando no meu potencial e me incentivando em cada oportunidade ao longo desses anos.

À Rosalina e ao Sergio pela orientação e pela luta diária para mantermos o adequado funcionamento do laboratório.

À minha turma de mestrado, pelas grandes pessoas que conheci. Pelo muito que aprendi e pelo quanto eu ri com vocês! Pela simplicidade e humor do Gustavo, pela paz “exterior” da Regiane, pela genialidade das tiradas da Anna, pelas gargalhadas em SP com a Ju e o Rodrigo, pelas conversas e cervejas com a Isabela e com o Hugo, pela tranquilidade da Maíra e pelo nervosismo da Cris, além da convivência com a Ana e o Wagner.

Obrigada por me ajudarem a tornar possível esse mestrado!

Lista de Tabelas e Gráficos

Figura 1. Risco global de falha de tratamento em 2 anos de seguimento	43
Tabela 1. Artigos que investigaram fatores de risco para falha de tratamento	14
Tabela 2. Distribuição das variáveis epidemiológicas e clínicas das 241 pacientes tratadas para lesões precursoras do câncer cervical.....	27
Tabela 3. . Distribuição dos tipos de HPV encontrados 6 meses após o tratamento.....	29
Tabela 4. Distribuição das características epidemiológica das mulheres do estudo, segundo o grupo de risco para HPV.....	30
Tabela 5. Distribuição das variáveis idade, paridade, tempo entre menarca e sexarca e tempo de tabagismo entre as mulheres com margens livres, segundo o grupo de risco do HPV em seis meses.....	32
Tabela 6. Distribuição do risco de possuir infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento	33
Tabela 7. Distribuição dos tipos de HPV encontrados 2 anos após o tratamento.....	35
Tabela 8. Distribuição das características epidemiológicas e clínicas, segundo o grupo de risco do HPV.....	36
Tabela 9. Descrição das variáveis idade, paridade, tempo entra menarca e sexarca e tempo de fumo entre as mulheres com margens livres, segundo o grupo de risco do HPV em dois anos.....	38
Tabela 10. Estimativas das razões de chances brutas e ajustadas relacionadas à infecção por HR-HPV dois anos após o tratamento.....	38
Tabela 11. Distribuição dos tipos de HPV encontrados nas 21 pacientes positivas para HR-HPV em 2 anos que possuíam informação sobre 6 meses após o tratamento.....	41

Tabela 12. Descrição do resultado histológico da segunda CAF e distribuição dos tipos de HPV encontrados.....	42
Tabela 13. Risco de falha de tratamento em 2 anos de seguimento de acordo com as variáveis selecionadas.....	44
Tabela 14. <i>Hazard Ratio</i> para falha de tratamento em dois anos de seguimento segundo positividade para HPV e comprometimento da margem endocervical.....	45

Lista de Abreviaturas e Siglas

ASC-H - Atypical squamous cells, cannot exclude HSIL (Atipias de Células Escamosas que não excluem Lesão de Alto Grau)

ASC-US - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado)

AGC – Atypical Glandular Cells (Atipias de Células Glandulares)

CAF – Cirurgia de Alta Frequência

CasKi – Linhagem celular positiva para DNA de HPV 16

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CO – Contraceptivo Oral

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxinucleotídeo Trifosfato

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

HE – Hematoxilina e Eosina

HPA – Hidrocarbonetos policíclicos Aromáticos

HPV – Papilomavírus Humano

HR-HPV – Papilomavírus Humano de Alto Risco

HR – *Hazard Ratio*

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC 95% - Intervalo de Confiança 95%

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

JEC – Junção Escamo-Colunar

LAG – Lesão de Alto Grau

LBG – Lesão de Baixo Grau

LR – *logrank test* (teste de log rank)

LR-HPV - Papilomavírus Humano de Baixo Risco

min – minuto

ml – mililitro

mM - Milimolar

ng – Nanograma

NIC – Neoplasia Intra-epitelial Cervical

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

Pb – Pares de base

RLU – *Relative Light Unit*

RC – Razão de Chance

rpm – Rotações por Minuto

s – segundo

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

tto - Tratamento

μl – Microlitro

X² - Teste Qui-quadrado

Resumo

Introdução: O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal fator de risco associado ao desenvolvimento e evolução das lesões precursoras do câncer cervical, mas para que uma célula normal evolua para uma célula neoplásica é necessária a ação de cofatores como idade, tabagismo e uso de contraceptivos orais. A evolução natural do câncer cervical passa por uma fase precursora chamada de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), cuja exérese é o tratamento indicado para impedir a evolução. No entanto, o acompanhamento das pacientes é fundamental para que seja possível diagnosticar e tratar possíveis falhas de tratamento durante o seguimento. Embora o principal fator associado à falha de tratamento seja a infecção pelo HPV após o tratamento, outros possíveis cofatores podem estar atuando, porém ainda não há um consenso na literatura.

Objetivo: Avaliar os fatores associados à positividade para HPV de alto risco (HR-HPV) e à falha de tratamento, em mulheres submetidas à exérese de lesões precursoras, num centro de referência do Rio de Janeiro. **Métodos:** Foi realizado um estudo exploratório de uma coorte hospitalar de 290 mulheres tratadas para NIC, composto de um estudo transversal em dois momentos (seis meses e dois anos após o tratamento), para avaliar a presença de infecção por HPV, e um estudo prospectivo para estimar o risco de falha de tratamento durante dois anos de seguimento. **Resultados:** A prevalência de infecção de HR-HPV foi de 24,7% e 18,2% aos seis meses e dois anos após o tratamento, respectivamente. O tempo entre a menarca e a sexarca >3 anos foi associado a um menor risco de infecção por HR-HPV aos seis meses (Razão de Chance = 0,48; IC 95% = 0,23 - 0,99). A infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento mostrou-se significativamente associada à presença de HR-HPV dois anos após o tratamento (RC = 4,27; IC 95% = 1,54 – 11,82). O risco global de falha de tratamento em dois anos de seguimento foi de 3,0%. As mulheres positivas para HPV entre três e seis meses apresentaram um risco de falha em dois anos de 8,5% (log rank = 0,006) e mulheres que tinham ao menos um teste positivo entre três e seis meses apresentaram uma *Hazard Ratio* = 12,25 (IC 95% = 1,55 – 96,91). O risco de falha para mulheres que apresentavam HR-HPV seis meses após o tratamento foi de 17,0% (log rank = 0,001). Mulheres com comprometimento endocervical das margens apresentaram um HR = 3,37 (IC 95% = 0,95 – 11,99). **Conclusão:** O presente estudo sugere que a presença da infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento e positividade para HPV aos três e seis meses podem aumentar significativamente o risco para falha de tratamento.

Abstract

Introduction: Human Papillomavirus is the main risk factor for CIN development and progression, nevertheless only HPV infection is not a sufficient cause for development of disease. Other co-factors such as age, smoking and oral contraceptive use have to be associated with HPV infection for CIN progression. The natural evolution for cervical cancer passes through a pre-neoplastic phase call Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). Even patients that are correctly treated should be followed after treatment of CIN to diagnose and treat possible treatment failures during follow-up. Although the main factor associated with cervical cancer and treatment failure is HPV, another possible cofactors could be involved, however this is not well established in literature.

Objectives: The present study has the goal to investigate the frequency of HR-HPV positivity and the risk of treatment failure during a two-year follow-up period of women treated in a reference center in Rio de Janeiro, Brazil. **Methods:** Within a hospital cohort of 290 women treated for CIN a cross-sectional study was performed at two points during follow-up to analyze HPV infection at 6 month and 2 years after treatment. Besides that, a prospective study was performed to identify the risk of treatment failure in 2 years. **Results:** HR-HPV infection was present in 24,7% e 18,2% of treated women, six months and two years after treatment, respectively. The time between menarche and first sexual intercourse > 3 years was associated with a lower risk of having a HPV infection 6 month after treatment (Odds Ratio = 0,48; IC 95% = 0,23 - 0,99). The main factor associated with HR-HPV infection 2 years after treatment was HR-HPV infection 6 month after treatment (OR = 4,27; CI 95% = 1,54 – 11,82). The global risk of treatment failure in a two year follow-up was 3,0%. Women HR-HPV positive between 3 and 6 months had a 8,5% risk of treatment failure (log rank = 0,006) and women who had at least one positive test between 3 and 6 months had a HR=12,25 (CI 95% = 1,55 – 96,91). The risk of treatment failure for HR-HPV infected women at 6 months after treatment was 17,0% (LR 95% = 0,001). Patients that had endocervical margin involvement presented an increased relative risk of a 3,37 (CI 95% = 0,95 – 11,99) of treatment failure. **Conclusions:** The present study suggests that HR-HPV presence after treatment and the presence of HPV 3 and 6 months after treatment could raise significantly the risk of treatment failure.

Sumário

Lista de Tabelas	iv
Listra de Abreviaturas e Siglas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Referencial Teórico	3
2.1. A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e seu papel na carcinogênese Cervical	3
2.2. Cofatores: Tabagismo, Idade e Uso de CO	4
2.3. Lesões Precursoras do Câncer Cervical e Tratamento	6
2.4. Insucesso no Tratamento e Fatores Associados	8
2.5. Projeto Matriz	16
3. Justificativa	17
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo Geral	18
4.2. Objetivos Específicos	18
5. Metodologia	19
5.1. Desenho de Estudo	19
5.2. Descrição da Coorte	19
5.3. Critérios de Elegibilidade	20
5.4. Classificação das variáveis	21
5.5. Coleta de material Biológico para detecção do HPV	22
5.6. Extração do DNA e Detecção do DNA de HPV	23
5.7. Detecção do DNA de HPV	23
5.8. Genotipagem do HPV	24
5.9. Análise Estatística	25
5.10. Aspectos Éticos	25
6. Resultados	26
6.1. Descrição da População de Estudo	26
6.2. Descrição da infecção por HPV seis meses após o tratamento	28
6.2.1. Prevalência da infecção por HR-HPV e fatores associados	30
6.3. Descrição da infecção por HPV dois anos após o tratamento	34
6.3.1. Prevalência da infecção por HR-HPV e fatores associados	35

6.4. Análise da persistência por tipo viral de HR-HPV	40
6.5. Falhas de Tratamento	41
6.5.1. Descrição e Tipos de HPV Encontrados	41
6.5.2. Risco de falha de Tratamento	43
7. Discussão	47
8. Conclusão	52
9. Considerações Finais	53
10. Referências bibliográficas	54
Anexos	63

1- Introdução

O câncer cervical é um grave problema de saúde pública no mundo todo, sendo a terceira neoplasia mais comumente diagnosticada e a quarta principal causa de morte por câncer em mulheres, respondendo por 9% (529.800) do total de novos casos de câncer e 8% (275.100) do total de mortes por câncer entre mulheres em 2008 (Jemal *et al*, 2011; Ferlay J *et al*, 2010). No Brasil, o câncer cervical ocupa o segundo lugar em incidência e mortalidade por neoplasia entre as mulheres (Ministério da Saúde, 2011).

Diferente de outros tipos de neoplasias, o câncer cervical apresenta uma história natural bem conhecida, com uma evolução que passa por lesões precursoras chamadas de Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) de alto e baixo grau. Essas lesões podem ser detectadas através do teste de Papanicolaou e, quando adequadamente tratadas, conferem um dos mais altos potenciais de prevenção primária dentre todas as neoplasias. Portanto, o câncer cervical é uma causa de morte evitável quando diagnosticado e tratado precocemente (Moore, 2006).

O principal fator associado à evolução das NICs é a infecção pelos tipos de alto-risco do Papilomavírus Humano (HR-HPV). Por outro lado sabe-se que o Papilomavírus Humano (HPV) é uma causa necessária, mas não suficiente para que esta neoplasia ocorra (Bosh *et al*, 2002; Muñoz *et al*, 2003), sendo necessária a atuação de cofatores de risco como a idade na primeira relação sexual, o número de parceiros, o histórico de doenças sexualmente transmissíveis, o tabagismo, o uso de contraceptivos orais e paridade (Muñoz *et al*, 2006; Yetimalar *et al*, 2011).

A principal estratégia de prevenção do câncer cervical é o rastreamento das lesões precursoras através do exame de Papanicolaou, seguido da retirada da lesão, que é o tratamento indicado, visando interromper o processo de evolução da doença (Karabulutlu *et al*, 2013). A Cirurgia de Alta Frequência (CAF) é o procedimento mais utilizado no tratamento das lesões de alto grau, porém, apesar de ser bastante eficiente, as pacientes podem apresentar uma recidiva da lesão inicial ou nova lesão ao longo do período de seguimento (dois anos), caracterizando o que a literatura chama de falha ou insucesso no tratamento (Boonlikit *et al*, 2008). Ainda não se sabe ao certo quais fatores estão associados à maior probabilidade de ocorrência dessas falhas. Dentre os fatores investigados é possível apontar a persistência da infecção por HPV, o status das margens, o grau inicial da lesão, a idade, entre outros, para o aumento na probabilidade de falha (Sarian *et al*, 2004; Kreimer *et al*, 2006).

A meta-análise realizada por Soutter e colaboradores (1997) incluindo seis estudos, totalizando 44.699 mulheres-ano, mostrou que o risco de desenvolvimento de um câncer invasivo após o tratamento conservador das lesões precursoras ainda era de quatro a cinco vezes maior do que na população geral.

Uma vez que o principal fator de risco apontado para essa falha tem sido a persistência da infecção por HR-HPV após o tratamento, estudar o comportamento da infecção por HR-HPV e os fatores associados à maior probabilidade de falha assume grande relevância, pois podem permitir um acompanhamento mais eficiente de mulheres que apresentam maior risco de desenvolver uma nova lesão e possivelmente um câncer cervical, contribuindo para gerar informações que contribuam para otimizar o acompanhamento das pacientes que possuem maior risco de falhar após o tratamento.

Além disso, conhecer os possíveis fatores ambientais que influenciam no processo de persistência e clareamento da infecção por HR-HPV após o tratamento é de grande importância, uma vez estes fatores são passíveis de intervenções na saúde pública. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo explorar uma coorte de mulheres submetidas ao tratamento conservador das lesões precursoras do câncer cervical aos seis meses e dois anos, considerando as variáveis selecionadas como possíveis cofatores de risco; além de avaliar o risco de falha no tratamento em dois anos de seguimento das mulheres tratadas para lesões precursoras do câncer cervical.

Em 2004 teve início no Hospital de Câncer – II/INCA um estudo intitulado “A influência do polimorfismo no códon 72 do gene *Tp53* na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero” que teve como objetivo avaliar o efeito de fatores genéticos na susceptibilidade de desenvolvimento do câncer cervical. De acordo com o protocolo deste estudo, as mulheres com resultado citológico apresentando lesões precursoras de baixo-grau (NIC1) de repetição ou lesões de alto-grau (NIC2/3) foram submetidas à colposcopia. Aquelas que apresentaram lesão à colposcopia foram tratadas através da CAF. Após o tratamento, essas mulheres foram seguidas por um período de dois anos. Este protocolo de estudo possibilitou a realização deste projeto, que visa avaliar a frequência da positividade para o HR-HPV após o tratamento das lesões precursoras e o risco de falha de tratamento em dois anos de seguimento.

2- Referencial Teórico

2.1- A infecção pelo HPV e seu papel na carcinogênese cervical

O HPV foi descrito pela primeira vez em 1907, por Giuseppe Ciuffo, mas apenas com os estudos de virologia molecular na década de 70 veio a ser mais compreendido (Ciuffo, 1907). Segundo a ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) os Papillomavírus pertencem à família Papillomaviridae e são classificados em gêneros, espécie, tipos, subtipos e variantes de acordo com as sequências de nucleotídeos da região L1 do genoma viral. O HPV é um vírus pequeno, com DNA de dupla fita, que infecta preferencialmente o tecido epitelial, incluindo aqueles do trato anogenital. (Boulet et al, 2007).

Existem mais de 100 tipos de HPV baseados nas diferenças das seqüências de seu DNA e são divididos em HPV de baixo-risco (LR-HPV) e HPV de alto-risco (HR-HPV) segundo seu potencial carcinogênico. Os tipos de baixo-risco como o 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e CP6108, estão mais fortemente associados às verrugas genitais enquanto os tipos de alto-risco como o 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 são frequentemente associados ao desenvolvimento das lesões de alto grau (Muñoz *et al.* 2003). Em recente atualização dos agentes carcinogênicos feita pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer - IARC) os tipos 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73, 82 foram classificados no grupo de prováveis alto-risco carcinogênicos (IARC, 2013).

A distribuição e a prevalência dos tipos de HPV variam entre as diferentes populações no mundo, porém o tipo 16 é o mais frequente na África Subsaariana, América do Sul, Ásia e Europa (Clifford *et al.*, 2005). Uma revisão de 14 estudos feita por Ayres e Silva (2010) mostrou que o tipo 16 também é o mais prevalente entre as mulheres brasileiras.

O ciclo viral do HPV está fortemente ligado ao programa de diferenciação do epitélio infectado. Os HPVs infectam inicialmente as células epiteliais basais, que constituem apenas uma camada de células num epitélio que está se dividindo ativamente. Seu ciclo de vida está diretamente ligado às células epiteliais em diferenciação e inicia quando partículas infecciosas entram em células da camada basal (Münger et al, 2004).

O progresso nos estudos do câncer cervical forneceu evidências de que a integração do DNA dos HR-HPV dentro do genoma da célula hospedeira resulta em uma elevação nos níveis de expressão das proteínas virais E6 e E7 com subsequente interação entre essas proteínas oncogênicas e a maquinaria do ciclo celular. A proteína E6 se liga ao produto do gene supressor tumoral *TP53*, degradando-o, e a proteína E7 se liga ao produto do gene do retinoblastoma, impedindo sua fosforilação e consequente ação reguladora do ciclo celular (Boulet *et al*, 2007). A inativação da p53 e da pRb impacta sobre múltiplos caminhos regulatórios na célula hospedeira facilitando o término do ciclo de vida do vírus (Clarke et al, 2001; Masumoto et al, 2003). Dessa forma, acredita-se que a instabilidade genômica causada por E6 e E7 permite que as células acumulem aberrações genômicas adicionais necessárias para passar para uma conversão maligna (Stanczuk et al, 2003).

Apesar da infecção por HPV ser uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns, a maioria das infecções é transitória, principalmente em mulheres jovens, fazendo com que indivíduos infectados possam eliminar o vírus espontaneamente. Assim, mesmo sendo o principal fator de risco associado à evolução das lesões precursoras do câncer cervical, a infecção por HPV é considerada causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença (Castellsague´ & Muñoz, 2003; Braaten & Laufer, 2008).

Para que haja o surgimento e evolução das NICs é preciso associação da infecção por HPV com cofatores que tornem essa infecção persistente e possibilitem sua progressão para as lesões precursoras do câncer cervical. Muñoz e colaboradores (2006) definem três grupos de cofatores potenciais: (1) cofatores ambientais, que incluem uso de contraceptivos orais (CO), tabagismo, paridade e co-infecções com outros agentes sexualmente transmissíveis; (2) cofatores virais, que incluem co-infecções por outros tipos de HPV, carga viral e integração viral; e (3) cofatores relacionados ao hospedeiro, incluindo hormônios endógenos, fatores genéticos e outros fatores relacionados à resposta imune.

2.2- Cofatores: Tabagismo, Idade e Uso de CO

O tabagismo vem sendo bastante estudado como cofator tanto no processo de tornar uma infecção por HPV persistente, quanto no processo de desenvolvimento das lesões precursoras. O tabagismo aumenta a duração das infecções por HPVs

oncogênicos e diminui a probabilidade de clareamento dessas infecções (Giuliano *et al*, 2002).

O cigarro possui substâncias carcinogênicas, como a nicotina e seus derivados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), dioxinas e outros carcinógenos que, vem sendo estudados quanto aos seus papéis na carcinogênese cervical (Acladiou et al, 2002). Essas substâncias são capazes prejudicar a resposta imune no epitélio cervical do hospedeiro, principalmente através da redução do número de células de Langerherans, que são células responsáveis pela imunovigilância cutânea através da captação, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T (Pratt et al, 2007). Além disso, a exposição do DNA das células cervicais a esses agentes carcinogênicos podem causar mutações e anormalidades na atividade gênica das células e no processo de divisão celular (Ramos et al, 2008).

Um estudo caso-controle de base populacional foi realizado por Kjellberg e colaboradores (2000), na Suécia, visando estudar a associação entre tabagismo, gravidez, dieta e uso de CO com o risco de desenvolvimento de NIC2/3. Foram comparadas mulheres com diagnóstico citológico normal com mulheres com diagnóstico citológico de NIC2/3. Os achados desse estudo mostraram um aumento de 2,6 vezes (IC 95% = 1,2-5,6) no risco de desenvolver uma NIC2/3 entre as mulheres fumantes comparadas às não fumantes, mesmo ajustando pela positividade para HPV, sugerindo uma associação independente entre tabagismo e desenvolvimento da lesão. As demais variáveis investigadas não se mostraram associadas, exceto pela variável gestação (já ter engravidado) que não apresentou associação com o risco de desenvolver NIC2/3 na análise bruta (OR=1,1; IC 95%=0,7-1,8), porém apresentou uma associação na análise ajustada (OR=4,5; IC 95%=1,6-12,8).

O efeito da idade no desenvolvimento das lesões precursoras está relacionado à maior exposição e vulnerabilidade das mulheres jovens às infecções por HPV. A maior exposição ao vírus está relacionada ao início da atividade sexual, que quanto mais precoce maior a oportunidade de se ter múltiplos parceiros e, conseqüentemente, maior probabilidade de adquirir infecções por HPV (Shew *et al*, 2005). A maior vulnerabilidade se dá através das diferenças no epitélio cervical que, em mulheres mais jovens, possui predominantemente células colunares e metaplásicas, enquanto em mulheres mais velhas o predomínio é de células escamosas (Silva *et al*, 2011). Quando o início da atividade sexual ocorre em idade precoce, existe a possibilidade da infecção por HPV afetar essas células metaplásicas imaturas da zona de transformação do colo

do útero aumentando o risco de desenvolvimento da célula neoplásica. Depois que alcançaram a maturidade, o risco de desenvolvimento de neoplasia cervical escamosa é menor (Cox, 1995).

O uso de contraceptivos orais (CO) também vem sendo estudado como outro cofator de risco associado ao desenvolvimento das NICs. O CO geralmente é utilizado por mulheres sexualmente ativas com parceiro único ou múltiplos parceiros e, por este motivo, pode também estar associado à exposição ao HPV, fazendo com que possa haver confundimento ao se estudar uso de CO no risco de desenvolver uma NIC (Syrjänen et al, 2006).

Os mecanismos pelos quais a influência hormonal modula o risco de progressão para lesões de alto grau ainda não são bem estabelecidos (Castellsague´ & Muñoz, 2003), porém o uso de CO pode aumentar esse risco através da influência dos hormônios em elementos hormônio-dependentes do genoma viral que vão aumentar assim a expressão viral do HPV. Além disso, a progesterona pode aumentar a transcrição do RNA mensageiro do vírus e estimular a replicação viral (de Villiers et al, 2003).

Em um estudo caso-controle multicêntrico realizado pela IARC utilizando protocolo similar em 8 países, para estudar o risco do uso de contraceptivos orais no desenvolvimento do câncer cervical, observou que o uso de CO por 5 anos ou mais aumentou em 3,69 vezes (IC 95% = 1,83-7,74) o risco de desenvolver câncer cervical entre mulheres HPV positivas (Moreno et al, 2002).

Outro importante ponto que vem sendo discutido são os fatores relacionados ao hospedeiro que influenciam tanto na persistência da infecção por HPV quanto na progressão para o câncer cervical. Dentre eles é possível citar a resposta imune do hospedeiro à infecção por HPV, a suscetibilidade genética relacionada a polimorfismos de genes reguladores do ciclo celular, genes supressores de tumor e a identificação dos eventos epigenéticos, que estariam modulando o processo de desenvolvimento das NICs (Wang et al, 2003).

2.3 - Lesões Precursoras do Câncer Cervical e Tratamento

As infecções iniciais por HPV podem se manifestar através de pequenas alterações no colo do útero. Essas alterações celulares podem ser detectadas através do exame de Papanicolaou e indicam a presença da infecção por HPV, no entanto a

confirmação da presença do vírus só pode ser diagnosticada por meio de testes de biologia molecular (Gravitt et al, 2000). De acordo com a classificação do Sistema Bethesda (2001) as alterações citológicas no epitélio escamoso são denominadas lesões intra-epiteliais e são caracterizadas em Lesões de Baixo Grau (LBG) ou Lesões de Alto Grau (LAG). Por outro lado, quando é feito o diagnóstico histológico, as alterações causadas por HPV são chamadas NIC 1, NIC 2 ou NIC 3, dependendo da profundidade das células anormais. A NIC 1 inclui displasia leve com lesões em que apenas um terço da profundidade do epitélio está anormal. A NIC 2 ou displasia moderada inclui lesões com proliferações anormais em até dois terços do epitélio. A NIC 3 inclui displasia severa e carcinoma *in situ*, que são lesões em que o epitélio inteiro encontra-se anormal. As alterações celulares que não podem ser classificadas como neoplasia intra-epitelial cervical, mas merecem uma investigação melhor, são classificadas como Atipias de Células Escamosas de Significado Indeterminado (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance - ASC-US), Atipias de Células Escamosas que não excluem Lesão de Alto grau (Atypical squamous cells, cannot exclude HSIL - ASC-H) e Atipias de Células Glandulares (Atypical Glandular Cells - AGC) (Apgar et al, 2003).

É necessário em média 20 anos para que uma célula normal evolua para o estágio de câncer invasivo. Essa evolução lenta é marcada por lesões precursoras detectáveis e curáveis o que possibilita que sejam feitos esforços preventivos através de programas de rastreamento do câncer cervical para evitar o desenvolvimento desta neoplasia (Anderson *et al*, 1988; Holowaty *et al*, 1999).

No entanto, mesmo sem tratamento, as NICs podem regredir espontaneamente. O processo de progressão e regressão das lesões está diretamente relacionado à presença, integração e carga viral do HPV. As LBG, em sua maioria, estão associadas aos HPVs de baixo-risco oncogênico e regredem espontaneamente. Já as LAG estão mais fortemente associadas aos HPVs de alto-risco oncogênico e apresentam um risco maior de progredirem para o câncer cervical (Moscicki et al, 2010).

As lesões intra-epiteliais têm que ser devidamente acompanhadas e tratadas, por meio de vários procedimentos distintos. Esses tratamentos podem variar entre os mais conservadores, como biópsia a frio, exérese da lesão a laser ou excisão por CAF; até procedimentos mais invasivos como as histerectomias (Martin-Hirsch *et al*, 2010).

Os tratamentos conservadores do colo do útero visam interromper o progresso da doença preservando o colo do útero o máximo possível. Podem ser realizados tratamentos ablativos, que destroem a lesão, como a cauterização e a crioterapia, ou

tratamentos excisionais, que retiram a lesão, como a conização e a cirurgia de alta frequência (CAF) (Derchain *et al*, 2005). A CAF, desde sua introdução em 1989 (Prendiville *et al*, 1989), é o tratamento mais utilizado para as LAG por ser um procedimento efetivo que utiliza anestesia local, remove menos tecido, requer um tempo menor de operação, é associado ao menor risco de hemorragia, dor e infecção, e é tão efetivo quanto às terapias cirúrgicas convencionais (Mathevet *et al*, 1994; Ferenczy *et al*, 1996). Além disso, essa técnica possibilita excluir a existência de doença invasiva, avaliar o comprometimento das margens cirúrgicas e preservar a fertilidade da paciente (Ramos *et al*, 2008).

O tratamento efetivo das lesões não apenas resulta na retirada completa da lesão como também deve está associado à maior probabilidade de eliminação da infecção pelo HPV. O processo de eliminação do vírus é chamado de clareamento da infecção e geralmente ocorre em até seis meses após o tratamento (Moore *et al*, 2011).

Um estudo feito por Tate e colaboradores mostrou que, depois de desenvolvida a lesão, raramente há presença de HPV nos tecidos normais adjacentes à NIC. Ou seja, há detecção de HPV em células normais antes da manifestação clínica da doença, porém depois do surgimento da lesão, ou o vírus é eliminado dos tecidos normais adjacentes, ou eles estão presentes, porém incapazes de produzir uma nova lesão devido a fatores do hospedeiro. Dessa forma, o tratamento usado, na maioria dos casos, irá resultar em uma citologia negativa e na eliminação do vírus. O fato, entretanto, de que algumas mulheres fiquem livres da lesão temporariamente, mas não da infecção por HPV, ressalta a necessidade de investigação dos outros fatores e mecanismos que levam à persistência do vírus após o tratamento (Tate *et al*, 1996).

Quando não há o clareamento da infecção, há o risco de desenvolvimento de uma nova lesão especialmente nos dois primeiros anos subsequentes ao tratamento (Kocken *et al*, 2011). Esse reaparecimento das lesões nos dois anos após o tratamento é o principal motivo pelo qual a maioria dos estudos investiga falha de tratamento nesse período.

2.4 – Insucesso no Tratamento e Fatores Associados

Apesar do tratamento para lesões precursoras do câncer cervical ser eficiente, as mulheres tratadas necessitam de acompanhamento pós-tratamento para identificação de possíveis recorrências da doença. Essas recorrências são chamadas de falhas de

tratamento e podem ser identificadas durante o período de seguimento em aproximadamente 5 a 36% das mulheres tratadas (Kocken et al, 2011; Sarian *et al*, 2004; Alonso *et al*, 2006; Silva et al, 2009).

Para avaliar se há diferença na probabilidade de falha devido ao uso de diferentes técnicas no tratamento, Martin-Hirsch e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática da literatura incluindo 29 ensaios clínicos e 7 técnicas cirúrgicas e concluíram que não há uma técnica de tratamento conservador que seja superior em termos de falha no tratamento e complicações pós-operatórias.

O principal fator que tem sido apontado para a falha no tratamento é a persistência dos HR-HPVs após o tratamento. A persistência da infecção indica que o colo do útero ainda está exposto ao principal fator oncogênico para o câncer cervical, indicando o aumento do risco de recorrência e progressão da doença (Bae et al, 2007; Kreimer *et al*, 2007).

Kreimer e colaboradores (2006), em um estudo prospectivo realizado em uma coorte nos EUA a partir do *ASCUS-LSIL triage study* (ATLS), sugeriram que a presença de HPV em amostras coletadas seis meses após o tratamento pode prever o surgimento de NIC após o tratamento. Os autores também mostraram que mulheres que ainda estão infectadas com ao menos um tipo de HR-HPV têm um risco 15% maior de desenvolver NIC em dois anos, enquanto as que estão infectadas por tipos não carcinogênicos ou negativas para HPV têm um risco de 1,5% e 0%, respectivamente. Já mulheres que eram positivas para HPV 16 seis meses depois da CAF têm um risco 40% maior de desenvolverem NIC em dois anos.

A definição de infecção persistente também vem sendo discutida na literatura. Geralmente uma infecção persistente é definida como aquela acontecendo em uma paciente que possua dois ou mais testes positivos para DNA de HPV. Mas também pode ser definida pelo tempo de clareamento ou pela proporção de testes positivos para HPV durante um período de seguimento. Além disso, os diferentes métodos de identificação dos laboratórios tornam ainda mais difíceis essas definições através da identificação ou não de HPV tipo-específico (Aerssens *et al*, 2008; Koshiol *et al*, 2008).

Outro estudo desenvolvido por Kreimer e colaboradores (2007), na mesma coorte, definiu persistência da infecção como o mesmo tipo de HPV presente antes e depois do tratamento. Já um estudo feito por Aerssens e colaboradores (2008), diferencia infecção persistente pelo mesmo tipo de HPV após o tratamento, situação em que a infecção não desaparece em momento nenhum durante o seguimento; de re-

infecção pelo mesmo tipo de HPV, quando o tipo de HPV presente no momento do tratamento não é encontrado em uma ou mais consultas durante o seguimento, porém volta a ser detectado; de re-infecção por outro tipo de HPV, quando o tipo inicial não é mais detectado durante o seguimento, porém outro tipo é encontrado.

Além da persistência da infecção por HPV, outros fatores têm sido estudados como estando envolvidos na ocorrência da falha de tratamento. O comprometimento das margens, a idade, o tabagismo, o tamanho da lesão antes do tratamento, a extensão endocervical da doença e excisão incompleta da lesão também estão associados à falha (Jakus *et al*, 2000; Brockmeyer *et al*, 2005).

A Tabela 1 apresenta os principais artigos que buscaram identificar fatores de risco para falha de tratamento, descrevendo as associações buscadas e as que foram encontradas pelos estudos. Todos os estudos incluídos foram realizados com mulheres tratadas para NIC através de métodos excisionais, com seguimento após o tratamento e que tiveram como definição de falha a confirmação histológica de NIC.

É possível observar que todos os 10 estudos que investigaram a presença de HPV após o tratamento, ou a persistência da infecção por HPV após o tratamento, como fator de risco, encontraram associação estatisticamente significativa com o aumento do risco de falha, variando de 1,44 (IC 95% = 1,23 – 1,70) no estudo de Alonso e colaboradores (2006) a 52,70 (IC 95% = 13,90 - 200,30) no estudo de Paraskevaïdis e colaboradores (2001) (Acladiou et al, 2002; Aerssens et al, 2009; Alonso et al, 2007; Bae et al, 2007; Laguevaque et al, 2010; Lubrano et al, 2012; Ryu et al, 2012; Sarian et al, 2005).

Em um estudo caso-controle aninhado numa coorte de mulheres tratadas para NIC na Inglaterra, no período de 1995 a 1999, Acladiou e colaboradores (2002) buscaram investigar se a detecção de HR-HPV após o tratamento e o tabagismo são fatores independentes no aumento do risco de falha no tratamento. Seus achados mostraram um aumento três vezes maior (IC 95% = 1,68–5,98) no risco de falha de tratamento para as fumantes comparado às não fumantes, e um aumento de 23,5 vezes maior (IC 95% = 3,2 – 172,5) no risco de falha para mulheres que eram HR-HPV positivas após o tratamento. Os autores observaram ainda que mesmo após o controle do efeito do HPV durante o seguimento esse risco foi significativamente maior entre as mulheres fumantes (RC = 19,34, IC 95% = 1,70 – 220,1) comparadas às não fumantes.

Já, Aerssens e colaboradores (2009), em um estudo prospectivo realizado na Bélgica e na Nicarágua, não encontraram associação entre tabagismo e aumento do

risco de falha de tratamento ($p = 0,408$). Essa discrepância poderia ser explicada pelo fato de que nesse estudo, a variável tabagismo foi classificada em fumante atual ou não fumante atual, sem considerar tempo de tabagismo ou carga tabágica. Sarian e colaboradores (2005), em outro estudo prospectivo onde avaliaram tabagismo como fator de risco para falha de tratamento, também não encontrou associação ($RC = 0,69$; $IC\ 95\% = 0,1 - 5,1$), porém, nesse artigo, os autores não descrevem a forma como esse dado foi coletado e tratado para as análises.

A ausência de associação nesses estudos comparada à presença de associação no estudo de Acladius (2002) pode ser explicada pela forma de coleta e tratamento dos dados coletados. Enquanto no trabalho de Acladius a informação sobre tabagismo foi coletada e tratada de forma detalhada considerando ser atual, ex ou nunca tabagista, além do tempo de fumo e da carga tabágica, nos estudos que não encontraram associação, essa variável foi coletada de forma agregada impedindo a classificação detalhada da exposição, prejudicando a diferenciação entre os grupos de mulheres expostas e não expostas ao fator de risco.

O status das margens tem sido apontado como fator preditor para falha no tratamento. Entretanto o método de diagnóstico de status das margens tem sido questionado, uma vez que um número importante de mulheres que são classificadas com margens livres apresenta falha no tratamento e pacientes com margens comprometidas evoluem para cura espontaneamente. Ou seja, mulheres com margens livres após a retirada da lesão ainda podem estar sob o risco de recorrência da doença (Paraskevaidis et al, 2000; Alonso *et al*, 2006, Lubrano et al, 2012).

Dos 14 estudos que pesquisaram a margem como fator de risco, sete encontraram associação estatisticamente significativa com o aumento do risco de falha de tratamento, que variou de 2,70 ($IC\ 95\% = 1,50 - 4,70$) a 39,08 ($IC\ 95\% = 4,40 - 347,18$) em mulheres com margens comprometidas comparadas às mulheres com margens livres (Lubrano et al ,2012; Ryu et al,2012).

Um estudo realizado por Nam e colaboradores (2009), com 77 pacientes com NIC 2/3 submetidas ao tratamento, e apresentando margens livres, sugeriu que a carga viral é um fator de risco para persistência da infecção por HPV. A carga viral foi avaliada utilizando RLU (*Relative Light Units*) ≥ 1 e os autores definiram como tendo carga viral alta as mulheres que apresentavam RLU/controlado positivo > 100 . Assim, foi observado que 24% das mulheres com carga viral alta possuíam infecção persistente

seis meses após a CAF. Já para mulheres com carga viral baixa, apenas 3,7% das mulheres possuíam infecção persistente seis meses após o tratamento.

Ainda assim, outros estudos têm mostrado o aumento do risco de falha de tratamento para mulheres que apresentam margens comprometidas. Boonlikt e colaboradores (2008) em um estudo retrospectivo analisando o histórico médico de 250 mulheres tratadas para NIC em Bangkok, na Tailândia, observaram um aumento de 3,43 vezes (IC 95% = 1,01 – 11,63) no risco de falha de tratamento para mulheres com margem endocervical comprometida comparado às mulheres com margem endocervical livre. Entretanto, mesmo após comparar as mulheres com margem endocervical comprometida com aquelas que apresentavam margem endocervical livre, foi observada uma associação de 3,43 vezes no aumento do risco de falha. Essa diminuição do risco pode ser devido à inclusão de mulheres com margens ectocervicais comprometidas no grupo de comparação, subestimando a magnitude da associação encontrada. Hamontri e colaboradores (2010), também na Tailândia, diferenciaram comprometimento endocervical, ectocervical e de ambas as margens e encontraram um aumento do risco para todas as categorias estudadas, comparado às margens livres (RC = 5,94; IC 95% = 3,70 – 9,53; RC = 7,78; IC 95% = 2,99 – 20,24; RC = 14,88; IC 95% = 6,10 – 36,29, respectivamente). Em estudo retrospectivo realizado na França com 352 pacientes tratadas para NIC, Leguevaque e colaboradores (2010), encontraram aumento do risco de falha de tratamento para mulheres com margem endocervical comprometida (RC = 4,48; IC 95% = 2,19 – 9,16), porém o risco para o comprometimento ectocervical foi de 1,08 sem significância estatística (IC 95% = 0,33 – 3,52). Os estudos de Hamontri e Leguevaque encontraram magnitudes de associação semelhantes quando mulheres com comprometimento endocervical das margens àquelas que apresentavam margens livres.

A idade como fator de risco para falha de tratamento não é consenso na literatura. Dos 13 artigos que pesquisaram a idade como fator de risco apenas dois encontraram associação estatisticamente significativa com aumento do risco de falha de tratamento (Silva et al, 2009; Hamontri et al, 2010). Esses dois estudos encontraram aumento no risco de falha para mulheres com mais de 50 anos. Silva e colaboradores sugerem que esse aumento do risco pode ser explicado por uma alteração da imunidade ou uma seleção, ao longo do tempo, dos HPV com maior potencial oncogênico, em mulheres mais velhas. Já Hamontri e colaboradores atribuem esta associação a um aumento na incidência de excisão incompleta em mulheres mais velhas pela dificuldade de identificação da zona de transformação no momento do tratamento. Outra possível

razão seria a maior duração de lesões multifocais e a lesões de maior extensão das mulheres mais velhas. Já Aerssens e colaboradores (2009) avaliaram a variável idade através da média entre os grupos e observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média de idade do grupo de mulheres que apresentou falha de tratamento e do grupo que não apresentou ($p = 0,368$). No estudo de Alonso e colaboradores (2006), não foi observada associação entre idade maior que 45 anos e falha de tratamento (p-valor não significativo). Boonlikt e colaboradores encontraram associação entre idade maior/igual a 50 anos e aumento do risco de falha, porém esse resultado não foi estatisticamente significativo (RC = 1,58; IC 95% = 0,29 – 8,67).

Desta forma, com base na literatura é possível observar que a identificação da presença da infecção por HR-HPV durante o seguimento de mulheres tratadas para NIC e dos fatores de risco para falha de tratamento podem servir como uma ferramenta de vigilância para identificar mulheres com alto risco de recorrência da lesão precursora do câncer cervical, podendo orientar e otimizar o padrão de seguimento e tratamento dessas mulheres.

Tabela 1. Artigos que investigaram fatores de risco para falha de tratamento

Autor/Ano	Tipo de estudo	Tempo Médio para Falha	Tratamento	Falha	Fatores investigados	Fatores de risco associados	Risco de Falha*	IC95% / p-valor
Acladiou et al, 2002, Inglaterra	Caso-controle aninhado	x	Biópsia/Laser Coagulação a frio	8,00%	Tabagismo/HPV	Tabagismo HPV pós tto	3,17 23,50	1,68 - 5,91 3,2 - 172,5
Aerssens et al, 2009, Bélgica e Nicarágua	Prospectivo	14 meses	CAF	9,40%	Idade/Tabagismo/CO/Paridade NºParceiros/Sexarca/HPV/Margem	HR-HPV pós tto Persistência do HPV	4,40 3,70	1,40 - 14,2 1,10 - 12,7
Alonso et al, 2006, Espanha	Coorte	8,7 meses	CAF	17,70%	Idade/HR-HPV/Margem	HR-HPV pós tto	1,44	1,23 - 1,70
Alonso et al, 2007, Espanha	Prospectiva Coorte	8,8 meses	CAF	28,60%	Idade/HR-HPV/Margem	Carga viral HR-HPV pós tto	1,72	1,29 - 2,29
Bae et al, 2007, Coreia	Retrospectiva	x	CAF	19,30%	Idade/HR-HPV/Margem	Persistência do HPV	4,73	<0,001
Boonlikit et al, 2008, Tailândia	Coorte retrospectiva	x	CAF	13,20%	Idade/Excisão incompleta/Margem	Carga viral pós tto Excisão incompleta	3,25 7,44	<0,002 3,08 - 17,98
Fonseca et al, 2011, Brasil	Caso-controle retrospectivo	x	CAF ou Conização	14,70%	Idade/Paridade/Tabagismo/CO/Margem/Extensão Glandular	Margem Endocervical Margem	3,43 15,00	1,01 - 11,63 <0,001
Ghaem-Maghani et al, 2010, Reino Unido	Coorte	x	Biópsia/ CAF	4,80%	Idade/Paridade/Margem/Envolvimento do canal	Envolvimento do canal	7,00	<0,008
Hamontri et al, 2010, Tailândia	Coorte retrospectiva	x	CAF	28,84%	Idade/Gravidez/Paridade/Menopausa/Envolvimento glandular/Margem	Idade >=50anos Margem Endocervical Margem Ectocervical	2,61 5,94 7,78	1,58 - 4,31 3,70 - 9,53 2,99 - 20,24
Legueyque et al, 2010, França	Retrospectivo	29 meses	Conização e CAF	12,20%	Idade/Margem/HR-HPV	Ambas Margem Endocervical HR-HPV pré tto	14,88 4,48 8,30	6,10 - 36,29 2,19 - 9,16 1,59 - 43,5
Lubrano et al, 2012, Espanha	Coorte retrospectiva	x	Conização	13,90%	Idade/Margem/HR-HPV	HR-HPV pós tto Margem HR-HPV pós tto	38,80 2,70 4,10	14,09 - 107,05 1,50 - 4,70 2,40 - 7,30

Paraskevaidis et al, 2001, Reino Unido	Caso-controle retrospectivo	x	CAF	x	HR-HPV/Margem	HR-HPV pós tto	52,70	13,90 - 200,30
Ryu et al, 2012, Coréia	Coorte Retrospectiva	14 meses	CAF	6,60%	Idade/HPV/Margem	Margem	39,08	4,40 - 347,18
Sarian et al, 2005, Brasil	Coorte prospectiva	x	CAF	15,30%	Idade/CO/Tabagismo/Sexarca/Margem/Envolvimento glandular/HR-HPV	HR-HPV pós tto	50,30	3,80 - 663,10
Silva, 2008, Brasil	Coorte Prospectiva	x	CAF	x	P53/Idade/Cor da pele/Margem/História Sexual/História Reprodutiva	Margem Endocervical	7,01	1,73 - 28,44
Silva et al, 2009, Brasil	Exploratório de coorte	x	CAF	x	Idade/Diabetes/Tabagismo/CO/Menopausa/Sexarca/NºParceiros/Paridade/Envolvimento Glandular	Idade >=50 anos	1,59**	1,04 - 2,41

X = ausência da informação

tto = tratamento

*Razões de Chance para falha de Tratamento

***Hazard Ratio*

2.5 – Projeto Matriz

O projeto matriz, intitulado “Contribuição dos fatores clínicos, epidemiológicos e genéticos na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero” foi desenvolvido na ENSP em colaboração com o INCA no período de 2004 a 2008. Esse estudo buscou determinar a contribuição de fatores clínicos, epidemiológicos e genéticos na evolução das lesões precursoras do câncer cervical bem como no insucesso no tratamento das NICs através do seguimento de uma coorte de mulheres atendidas no Instituto Nacional de Câncer (INCA) no período de outubro de 2004 a maio de 2006 e seguidas até maio de 2008.

Um dos achados desse estudo foi que o polimorfismo TP53/Pro72 parece estar associado ao aumento do risco de falha no tratamento das lesões precursoras, apesar de não ter sido estatisticamente significativo (argilina/argilina comparado a heterozigoto HR = 1,51 IC 95% = 0,23 – 9,80; prolina/prolina comparado a heterozigoto HR = 1,41 IC 95% = 0,31 – 6,52). Além disso, o envolvimento das margens (HR = 7,01; IC 95% = 1,33 – 28,44) e o tabagismo (HR = 3,90; IC 95% = 1,28 – 11,91) também estiveram associados ao aumento do risco de falha (Silva, 2008).

A investigação da presença de HR-HPV após o tratamento e do risco de falha de tratamento durante o seguimento foram dois aspectos não abordados nesse estudo e possibilitou a realização desta dissertação, que tem como objetivo avaliar a frequência de positividade para HR-HPV após o tratamento e o risco de falha de tratamento, em uma coorte hospitalar de mulheres portadoras de lesões precursoras, que foram tratadas em um centro de referência do Rio de Janeiro.

3 – Justificativa

O câncer cervical ainda é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O rastreamento e o tratamento das lesões precursoras do câncer cervical são as medidas mais eficazes para controle da incidência e mortalidade por esta neoplasia. No entanto, devido à probabilidade de falha no tratamento (5% a 36%) torna-se necessário o seguimento rigoroso das mulheres submetidas à exérese das lesões.

Considerando que ainda não estão bem estabelecidos quais são os fatores associados à presença de HR-HPV e à falha após o tratamento da NIC, estudos com esta abordagem assumem grande relevância, pois poderiam contribuir para a modificação do padrão de seguimento das mulheres submetidas ao tratamento conservador dessas lesões, permitindo a seleção de grupos com maior probabilidade de apresentar infecção por HR-HPV no seguimento e, conseqüentemente, maior probabilidade de falha.

Ademais as informações produzidas neste estudo poderiam contribuir para otimizar o acompanhamento das pacientes que possuem maior risco de falhar após o tratamento e fornecer subsídios para a orientação dos programas de controle desta neoplasia na população brasileira.

4 – Objetivos

4.1 - Objetivo geral

Avaliar os fatores associados à falha de tratamento e à presença das infecções por HPV em um seguimento de dois anos de uma coorte hospitalar de mulheres tratadas para lesões precursoras do câncer cervical, numa unidade de referência do Rio de Janeiro.

4.2 - Objetivos específicos

- Determinar o perfil da infecção por HPV segundo tipo viral em seis meses e dois anos após o tratamento conservador para lesões precursoras do câncer cervical;
- Determinar a prevalência dos tipos virais de HPV presentes nas mulheres que apresentaram falha de tratamento durante o período de seguimento.
- Estimar o risco de infecção por HPV seis meses e dois anos após o tratamento, segundo os fatores epidemiológicos e clínicos selecionados;
- Estimar o risco de falha de tratamento em dois anos, segundo a presença e o tipo de HPV.

5 – Metodologia

5.1 - Desenho de Estudo

O presente trabalho é um estudo exploratório de uma coorte hospitalar de mulheres atendidas no Instituto Nacional de Câncer (INCA), um hospital de referência localizado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, formada a partir do estudo de Silva e colaboradores (2008). Foi realizado um estudo transversal aos seis meses e dois anos após o tratamento conservador de lesões precursoras do câncer cervical e um estudo prospectivo visando estimar o efeito da infecção por HPV no risco de falha no tratamento durante o seguimento de dois anos.

5.2 - Descrição da coorte

A coorte foi formada por mulheres com alterações colpocitológicas que apresentavam indicação para colposcopia, atendidas no INCA no período de outubro de 2004 a maio de 2006 e que foram seguidas até maio de 2008. Foram incluídas na coorte as mulheres com idade igual ou superior a 18 anos e que não tinham sido submetidas a nenhum tratamento cervical nos últimos seis meses. Foram excluídas mulheres que eram HIV positivas, que tinham condições psíquicas ou déficit cognitivo grave, e aquelas que não assinaram o termo de consentimento (por analfabetismo sem parente alfabetizado como testemunha ou por recusa).

Dentre as 463 mulheres que cumpriram os critérios de elegibilidade 445 assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1), perfazendo um total de 18 (3,9%) recusas. Após consentirem em participar do estudo, essas mulheres foram submetidas ao exame clínico e foi aplicado um formulário estruturado (Anexo 2) para coleta dos dados sobre idade, cor da pele, nível educacional, idade na menarca, idade na primeira relação sexual (sexarca), paridade, número de abortos, menopausa, número de parceiros sexuais, história de doença sexualmente transmissível (DST), método contraceptivo usado, histórico de co-morbidade (diabetes mellitus, hipertensão e obesidade) e tabagismo.

Todas as pacientes com alteração colpocitológica de baixo ou de alto grau foram submetidas à lavagem da região cervical e do trato genital inferior com uma solução de ácido acético de 4-6% e à colposcopia. Durante o exame colposcópico as mulheres

poderiam apresentar quatro situações clínicas distintas dependendo da possibilidade de visualização da Junção Escamo-Colunar (JEC) pelo cirurgião ginecológico: satisfatória sem lesão (JEC visualizada, mas sem lesão visível), satisfatória com lesão (JEC visualizada, com lesão visível), insatisfatória sem lesão (JEC não visualizada, sem lesão visível) e insatisfatória com lesão (JEC não visualizada, com lesão visível). Quando não havia lesão visível à colposcopia, as mulheres foram submetidas à conduta expectante, ou seja, foram seguidas com o exame colpocitológico a cada 4 meses durante dois anos. As mulheres que apresentavam lesão ao exame colpocitológico tiveram suas lesões biopsiadas ou totalmente retiradas por CAF. Tanto a colposcopia quanto o tratamento foram realizados por médicos especialistas em ginecologia oncológica.

Após o tratamento as pacientes foram então acompanhadas por um período de dois anos através de exames de Papanicolaou e, quando necessário, por colposcopia. O seguimento foi realizado com uma consulta a cada três meses no primeiro ano e a cada quatro meses no segundo. Em cada consulta foi coletada também uma amostra de *swab* cervical para posterior detecção e tipagem de HPV.

Os diagnósticos histológicos e colpocitológico foram realizados pelo Departamento de Patologia do INCA através de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) para classificação da lesão cervical de acordo com o Sistema Bethesda (Apgar et al, 2003).

5.3 - Critérios de elegibilidade

Para a realização do estudo foram incluídas somente as mulheres da coorte que possuíam diagnóstico citológico de lesões precursoras e que foram submetidas ao tratamento.

Para análise da positividade da infecção por HPV após o tratamento foram incluídas mulheres que possuíam amostra de *swab* cervical seis meses e/ou dois anos após o tratamento.

Para avaliação da falha de tratamento foram incluídas as mulheres que possuíam ao menos uma consulta de seguimento após a avaliação da presença de HPV.

5.4 - Classificação das variáveis

Foi definido como falha de tratamento as mulheres que tiveram confirmação histológica de NIC após o tratamento e que tivessem pelo menos uma citologia normal entre o tratamento e a falha. Os diagnósticos de ASC-US e ASC-H na citologia entre o tratamento e a falha foram considerados como citologias normais para o critério de falha.

As variáveis epidemiológicas utilizadas do formulário para as análises foram as seguintes: idade, cor da pele, idade na menarca, idade na sexarca, paridade, número de parceiros sexuais ao longo da vida, uso de contraceptivo oral e tabagismo.

A variável idade foi categorizada em faixas etárias de 18 a 28 anos, 29 a 45 anos e maior de 45 anos, a variável de cor da pele foi auto-referida e dividida em três categorias, branca, parda e negra de acordo com os critérios definidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoeendimento/pnad2006/notas_brasil.pdf). A variável idade na menarca foi categorizada em ≤ 13 anos e > 13 anos, a idade na sexarca foi categorizada em ≤ 15 anos e > 15 anos. A paridade foi categorizada em 0 a 1 parto, 2 a 3 partos ou mais de 3 partos. O número de parceiros sexuais foi categorizado em 1 a 2 parceiros, 3 a 4 parceiros ou mais de 5 parceiros ao longo da vida.

A variável uso de CO foi classificada em atual usuária (definida como mulheres que utilizaram CO por pelo menos seis meses antes da entrevista), ex-usuária (mulheres que haviam deixado de usar CO por um ano ou mais) e nunca usuária (mulheres que utilizaram CO por menos de seis meses ao longo da vida). O tempo de uso de CO também foi considerado e essa variável foi categorizada em ≤ 10 anos de uso e > 10 anos.

A variável tabagismo foi classificada segundo os critérios estabelecidos pela IARC como fumante atual, ex-fumante e não fumante e, para ser considerada fumante ou ex-fumante, a mulher deveria ter consumido mais de 100 cigarros ao longo da vida (IARC, 2004). Além disso, o tempo de tabagismo e a carga tabágica foram considerados. O tempo de tabagismo foi categorizado em ≤ 17 anos de uso e > 17 anos. Para estimar o número de cigarros fumados ao longo da vida foi utilizado o cálculo de pacotes-ano de cigarros consumidos. Esse cálculo foi realizado através do número de pacotes de cigarros consumidos por dia multiplicado pelo número de anos de consumo e

a variável foi categorizada em $\leq 2,5$ pacotes-ano ou $> 2,5$ pacotes-ano. Os pontos de corte foram definidos da mesma forma que das outras variáveis.

Os pontos de corte das variáveis contínuas foram estabelecidos de acordo com a média, mediana e os quartis do grupo de mulheres HPV negativas em 6 meses e ao final de dois anos de seguimento.

As variáveis clínicas e moleculares usadas foram citologia anterior ao tratamento, comprometimento das margens cirúrgicas (margem livre, margem ectocervical comprometida e margem endocervical comprometida), presença ou ausência de HPV e tipos de HPV detectados aos seis meses, aos dois anos e no momento das falhas de tratamento. Os tipos de HPV presentes nas amostras foram categorizados em tipos de alto-risco carcinogênico, incluindo nesse grupo os tipos carcinogênicos e de provável risco carcinogênico de acordo com os critérios da IARC (IARC 2013), e em tipos de baixo-risco carcinogênico (Munoz et al, 2003), incluindo nesse grupo os tipos de risco desconhecido.

Para as análises de sobrevida foram consideradas a positividade para LR-HPV e HR-HPV em seis meses e informações sobre positividade para HPV entre três e seis meses, utilizando informações das pacientes que tinham teste para HPV três meses após o tratamento. Para esta última análise foi construída uma variável considerando positividade para HPV em algum momento entre três e seis meses de seguimento, assim pacientes com um teste para HPV foram classificadas como positivas ou negativas baseado nesse único resultado e pacientes que possuíam dois testes para HPV foram classificadas como positivas, quando eram positivas em algum momento e negativas quando tinham ambos resultados negativos.

5.5 - Coleta de material Biológico para detecção do HPV

Os dois *swabs* coletados em cada consulta de seguimento foram conservados em solução de carnoí modificado (solução composta de ácido acético com álcool absoluto). Para avaliação da positividade da infecção por HR-HPV após o tratamento foi utilizado o DNA extraído de células cervicais coletadas nos swabs de seis meses e dois anos após tratamento das pacientes. Para avaliação do tipo de HPV presente nas falhas foi utilizado o *swab* coletado três meses antes do segundo tratamento.

5.6 - Extração do DNA e Detecção do DNA de HPV

Para obtenção do material para extração do DNA genômico, os dois *swabs* cervicais imersos na solução de carnoi modificado presente nos tubos *falcon* foram friccionados entre si com o objetivo de soltar as células contidas neles e liberá-las para o meio líquido presente no tubo. Após este processo os tubos foram centrifugados por 10min a 3000 rpm para a formação do *pellet* e a solução de carnoi foi descartada. Em seguida as amostras foram lavadas com 3ml de *Phosphate-Buffered Saline* 1x (PBS), vortexadas e centrifugadas por 5min a 3000rpm. Após o descarte do PBS foi adicionado 8ul de Proteinase XIV 20mg/ml em cada tubo e as amostras ficaram em banho-maria por duas horas, a 60°C. Depois desta etapa inicial, as amostras foram submetidas à extração de DNA com o Kit da Promega®, segundo as especificações do fabricante. As amostras extraídas foram armazenadas em tubos eppendorf 1,5 mL e estocadas em freezer -20°C.

5.7 - Detecção do DNA de HPV

A detecção do DNA do HPV foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) para amplificação de um fragmento da região *L1* do capsídeo do vírus utilizando *Taq Platinum* (Invitrogen). Foi realizada uma primeira PCR com os iniciadores PGMY (Gravitt et al. 2000) e após esta etapa foi realizada uma *nested*-PCR com os iniciadores GP05/GP06+ (de Roda Husman et al. 1995) a partir do produto amplificado pela primeira reação.

Para a primeira etapa foram utilizados entre 100 e 200 nanogramas (ng) de DNA genômico, 0,1μM dos iniciadores PGMY, 200μM de cada dNTP, 1mM de Mg⁺² e 1U de *Taq Platinum* (Invitrogen), completando um volume final de 50 microlitros (μl) com água Milli-q. A reação foi feita em um termociclador da marca Axygen® sob as seguintes condições: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto (min) a 94°C para desnaturação da cadeia, 40 segundo (s) a 55°C para anelamento dos *primers* e 40s a 72°C para extensão da cadeia, além de um ciclo final de 5min a 72°C. Essa reação produziu fragmentos de 450 pares de bases (pb) que foram utilizados como base para a segunda reação.

Para a segunda etapa foram utilizados 5ul do produto de PCR da primeira reação, 2μM dos iniciadores GP05/06+, 200μM de cada dNTP, 2mM de Mg⁺² e 1U de

Taq Platinum (Invitrogen), também completando um volume final de 50ul com água Milli-q. A segunda reação foi realizada sob as condições de um ciclo inicial de 5min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 40s a 94°C para desnaturação da cadeia, 40s a 55°C para anelamento dos *primers* e 40s a 72°C para extensão da cadeia, além de um ciclo final de 5min a 72°C. Essa reação produziu fragmentos de 140 pb que foram utilizados como substrato para a identificação do tipo de HPV.

Foram utilizados como controle positivo para as reações de PCR o DNA isolado da linhagem CaSKi (HPV 16) e como controle negativo água Milli-Q. Como controle da integridade e qualidade do DNA, todas as amostras foram submetidas a uma PCR com iniciadores para amplificação do gene constitutivo de β -globina humana. Essa reação teve como controle positivo 100ng de DNA genômico e como controle negativo água Milli-Q.

5.8 - Genotipagem do HPV

O produto de PCR das amostras positivas para HPV na primeira e/ou segunda etapa foi purificado com kit de purificação da Invisorb[®], segundo especificações do fabricante, para posterior sequenciamento dos fragmentos.

A técnica de sequenciamento foi utilizada para identificação dos tipos virais presentes nas amostras e foi realizada através da Plataforma de Sequenciamento de DNA Genômico da FIOCRUZ (Otto et al. 2008). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando 2,5 μ L de *Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.1* (Applied Biosystems), 3,2pmoles do iniciador, 2 a 5 μ L do produto de PCR purificado e água Milli-Q q.s.p 10 μ L. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 96°C por 10s, para desnaturação dos fragmentos amplificados; 50°C por 5s, para anelamento do *primer* e 60°C por 4min, para extensão da cadeia.

A primeira etapa para o processo de identificação dos tipos de HPV presentes nas amostras foi realizada através da edição e do alinhamento das sequências obtidas pelo sequenciamento, utilizando o programa MEGA 5.0. Após essa etapa, as sequências foram analisadas através do programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e as sequências de referência dos tipos virais indicados nessa análise foram obtidas do GenBank. A confirmação dos tipos obtidos pelo BLAST foi feita por análises filogenéticas realizadas com o programa MEGA 5.0, método *Neighbor-Joining* e Kimura 2-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica (Tamura et al. 2011).

Após a identificação, os tipos de HPV presentes nas amostras foram classificados em tipos de alto-risco carcinogênico ou tipos de baixo-risco carcinogênicos como descrito *a priori* (Muñoz *et al.* 2003; IARC 2013).

5.9 - Análise Estatística

Foi efetuada uma análise descritiva com as distribuições das frequências e proporções da positividade para HR-HPV em 6 meses e em 2 anos após o tratamento, segundo as variáveis clínicas e epidemiológicas.

As comparações entre as médias foram realizadas utilizando o teste *t-Student*. A significância estatística das diferenças entre proporções foram analisadas através do teste qui-quadrado (X^2). Para ambos os testes foi considerado um grau de significância de 0,05.

Em seguida foram estimadas as Razões de Chances (RC) brutas e ajustadas, com seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) de 95%, através da regressão logística não condicional. Esta análise foi feita visando estimar o risco de apresentar uma infecção por HR-HPV em seis meses e dois anos após o tratamento, segundo as variáveis selecionadas.

Foi estimado o risco de falha de tratamento em dois anos de seguimento através do método de Kaplan Meier. As diferenças entre as curvas foram avaliadas utilizando o teste de log rank, 95%. As *Hazards Ratios* (HR) para falha de tratamento e seus respectivos IC 95% foram estimados através da Regressão proporcional de Cox.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS versão 17.

5.10 - Aspectos Éticos:

O projeto maior de onde originou o presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Ensp/Fiocruz e do INCA em 2004 (Anexo 3). Todas as pacientes incluídas no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e os questionários são mantidos em sala com chave, com acesso restrito à equipe do estudo.

O presente projeto cumpre as exigências da resolução 196/96 e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Ensp/Fiocruz em 2012 (Anexo 4).

6 – Resultados

6.1 – Descrição da população de estudo

Duzentas e noventa mulheres foram submetidas ao tratamento das lesões precursoras do câncer cervical entre outubro de 2004 e maio de 2006. Dentre as 290 mulheres, 49 (16,9%) não tiveram o *swab* de seguimento coletado em 6 meses ou em 2 anos após o tratamento. Assim, as características das 241 (83,1%) mulheres que puderam ser avaliadas quanto à presença de HR-HPV durante o seguimento estão descritas na Tabela 2. As frequências de idade, cor e citologia de entrada das 49 perdidas e das 241 mulheres que tinham *swab* cervical foram comparadas e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

De acordo com a Tabela 2, 43,2% das mulheres tinham entre 29 e 45 anos e aproximadamente 80,0% tinham até 45 anos. No grupo estudado, metade da população declarou-se parda e a maioria, 63,5%, teve a primeira menstruação (menarca) com idade igual ou menor a 13 anos. A maioria das pacientes teve a primeira relação sexual (sexarca) com idade acima de 15 anos e 51,9% apresentou um tempo entre a menarca e a sexarca menor ou igual a 3 anos. Aproximadamente 35,0% das pacientes tiveram de 1 a 2 parceiros ao longo da vida e 65,0% tiveram 3 ou mais parceiros ao longo da vida. Em torno de 50,0% das mulheres tiveram de 2 a 3 filhos e apenas 14,5% nunca fizeram uso de CO, das que já tinham feito uso de CO, 64,7% usaram por um período 10 anos ou menos. Cinquenta por cento das pacientes nunca havia fumado. Entre as fumantes, 50,8% fumaram por mais de 17 anos e 75,0% fumaram mais de 2,5 pacotes-ano. Quanto à citologia antes do tratamento, 75,5% possuía citologia de lesão de alto grau. Em relação ao comprometimento das margens, aproximadamente 70,0% das pacientes apresentaram margens livres.

Tabela 2. Distribuição das variáveis epidemiológicas e clínicas das 241 pacientes tratadas para lesões precursoras do câncer cervical.

Variáveis	N (%)	IC 95%
Idade		
18-28	89 (36,9)	30,82 - 43,36
29-45	104 (43,2)	36,81 - 49,67
>45	48 (19,9)	15,07 - 25,52
Cor		
Branca	71 (29,5)	23,78 - 35,65
Parda	121 (50,2)	43,72 - 56,69
Negra	49 (20,3)	15,44 - 25,97
Menarca (anos)		
<= 13	153 (63,5)	57,06 - 69,57
>13	88 (36,5)	30,43 - 42,94
Sexarca (anos)		
<=15	86 (35,7)	29,24 – 41,66
>15	155 (64,3)	57,91 – 70,36
Sexarca – Menarca (anos)		
<= 3	125 (51,9)	45,36 – 58,33
> 3	116 (48,1)	41,67 – 54,64
Número de Parceiros		
1-2	83 (34,4)	28,46 - 40,81
3-4	75 (31,1)	25,33 - 37,38
>=5	83 (34,4)	28,46 - 40,81
Paridade		
0-1	82 (34,0)	28,07 – 40,38
2-3	116 (48,1)	41,67 – 54,64
>3	43 (17,8)	13,22 – 23,27
Uso de CO		
Nunca	35 (14,5)	10,33 - 19,62
Ex-usuária	150 (62,2)	55,79 - 68,38
Atual	56 (23,2)	18,06 - 29,09
Tempo de uso de CO		
<= 10 anos	156 (64,7)	58,34 - 70,76
> 10 anos	85 (35,3)	29,24 - 41,66
Tabagismo		
Nunca	121 (50,2)	43,72 - 56,69
Ex-tabagista	53 (22,0)	16,93 - 27,76
Atual	67 (27,8)	22,24 - 33,92
Tempo de Tabagismo		

<=17 anos	59 (49,2)	39,93 - 58,45
>17 anos	61 (50,8)	41,55 - 60,07
Pacotes-ano		
<= 2,5	30 (25,0)	17,55 - 33,73
> 2,5	90 (75,0)	66,27 - 82,45
Citologia		
LBG	59 (24,5)	19,19 - 30,41
LAG	182 (75,5)	69,59 - 80,81
Comprometimento das Margens		
Livres	140 (68,0)	61,12 - 74,27
Ectocervical +	38 (18,4)	13,4 - 24,43
Endocervical +	16 (7,8)	4,5 - 12,31
Ecto e Endo +	12 (5,8)	3,06 - 9,95

*Os totais podem variar devido aos *missings*.

6.2 – Descrição da infecção por HPV seis meses após o tratamento

Para a análise da positividade da infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento, 49 (16,9%) pacientes não possuíam amostra de swab cervical de seguimento para avaliação da presença/ausência da infecção. Sendo assim, foram realizadas as técnicas de extração do DNA das células cervicais, detecção do DNA viral e avaliação da qualidade do DNA genômico em 241 amostras.

Após a realização das técnicas de PCR, foram excluídas das análises 51 amostras (21,2%) em que não ocorreu a amplificação dos fragmentos de DNA do vírus, nem a amplificação dos fragmentos do DNA genômico com os *primers* de beta-globina humana. Essa exclusão foi realizada pela impossibilidade de identificar se essas amostras não apresentaram fragmentos amplificados de DNA de HPV pela ausência do vírus, ou pela inibição do processo de amplificação por degradação do DNA ou algum outro agente inibidor. As frequências da idade, cor e citologia das pacientes excluídas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas do restante do grupo avaliado.

Dessa forma, das 290 pacientes tratadas, foi obtida a informação sobre o status da infecção por HPV seis meses após o tratamento em 190 (65,5%) delas. Em 60 (31,6%) mulheres foi identificado DNA de HPV nas amostras cervicais, essas amostras foram então sequenciadas para identificação do tipo de HPV presente na amostra de

cada paciente e classificação dos tipos em baixo ou alto risco oncogênico. Os tipos encontrados estão indicados na Tabela 3. De acordo com esta tabela, dentre as mulheres positivas para HPV a maioria dos HPV's detectados eram de alto risco oncogênico (78,3%), sendo que o HPV 16 e o HPV 31 foram os tipos mais frequentes estando cada um presente em 16,7% das amostras, seguido pelo HPV 58, tipo presente em 13,3% das amostras.

Tabela 3. Distribuição dos tipos de HPV encontrados 6 meses após o tratamento.

HPV	N (%)
Tipo	
Alto Risco	47 (78,3)
16	10 (16,7)
18	2 (3,3)
31	10 (16,7)
35	4 (6,7)
45	1 (1,7)
51	3 (5,0)
52	2 (3,3)
53	1 (1,7)
58	8 (13,3)
59	1 (1,7)
66	2 (3,3)
68	1 (1,7)
70	1 (1,7)
82	1 (1,7)
Baixo Risco	13 (21,7)
32	1 (1,7)
54	4 (6,7)
61	1 (1,7)
72	2 (3,3)
81	2 (3,3)
89	2 (3,3)
90	1 (1,7)

6.2.1 - Prevalência da infecção por HR-HPV e fatores associados

As pacientes positivas para LR-HPV foram incluídas no grupo das pacientes HPV negativas, para servirem como grupo de comparação. Assim, comparadas às 190 mulheres avaliadas, 47 mulheres (24,7%) apresentaram infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento. A positividade para HR-HPV seis meses após o tratamento de acordo com as variáveis epidemiológicas e clínicas, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição das características epidemiológicas das mulheres do estudo, segundo o grupo de risco para HPV.

Variável	HPV		p-valor
	Alto Risco	Baixo Risco/Negativa	
Idade			
18-28	21 (28,8)	52 (71,2)	
29-45	18 (23,7)	58 (76,3)	0,526
>45	8 (19,5)	33 (80,5)	
Cor			
Branca	15 (25,4)	44 (76,4)	
Parda	22 (23,2)	73 (76,8)	0,852
Negra	10 (27,8)	26 (72,2)	
Paridade			
0-1	13 (21,0)	49 (79,0)	
2-3	24 (26,7)	66 (73,3)	0,703
>3	10 (26,3)	28 (73,7)	
Nº Parceiros			
1-2	17 (25,8)	49 (74,2)	
3-4	21 (36,8)	36 (63,2)	0,010
>=5	9 (13,4)	58 (86,6)	
Menarca			
<= 13 anos	28 (22,8)	95 (77,2)	0,393
> 13 anos	19 (28,4)	48 (71,6)	
Sexarca			
<= 15 anos	19 (27,1)	51 (72,9)	0,557
> 15 anos	28 (23,3)	92 (76,7)	
Sexraca – Menarca			

<= 3 anos	31 (31,0)	69 (69,0)	0,035
> 3 anos	16 (17,8)	32 (80,0)	
Uso de CO			
Não	7 (25,9)	20 (74,1)	0,971
Ex-usuária	29 (24,2)	91 (75,8)	
Sim	11 (25,6)	32 (74,4)	
Tempo de uso de CO			
<= 10 anos	32 (26,4)	89 (73,6)	0,413
> 10 anos	8 (20,0)	32 (80,0)	
Tabagismo			
Nunca	25 (27,8)	65 (72,2)	0,646
Ex-tabagista	9 (69,2)	4 (30,8)	
Atual	13 (68,4)	6 (31,6)	
Tempo de Tabagismo			
<= 17 anos	9 (17,3)	43 (82,7)	0,238
> 17 anos	13 (27,1)	35 (72,9)	
Pacotes -ano			
<= 2,5	4 (15,4)	22 (84,6)	0,344
> 2,5	18 (24,3)	56 (75,7)	
Citologia			
LBG	9 (20,9)	34 (79,1)	0,511
LAG	38 (25,9)	109 (74,1)	
Margem			
Livre	27 (22,7)	92 (77,3)	0,854
Comprometida	12 (24,0)	38 (76,0)	
Margem Endocervical			
Livre	31 (21,1)	116 (78,9)	0,113
Comprometida	8 (36,4)	14 (63,6)	

É possível observar que 22,7% das mulheres que tinham margens livres apresentaram infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento. Além disso, 31,0% das mulheres que tiveram um tempo entre a menarca e a sexarca <=3 anos apresentaram positividade pra HR-HPV, enquanto apenas 17,8% das que tinham esse tempo >3 anos eram HR-HPV positivas em seis meses. Em relação ao tabagismo, apenas 27,8% das mulheres nunca tabagistas eram HR-HPV positivas comparado a 69,2% e 68,4% em

mulheres ex ou atual tabagistas, respectivamente. Quanto ao comprometimento da margem endocervical, 36,4% das mulheres que tinham a margem endocervical comprometida eram HR-HPV positivas em 6 meses comparado à 21,1% de positividade para quem tinha a margem endocervical livre.

A Tabela 5 descreve a idade, a paridade, o tempo entre a menarca e a sexarca e o tempo de tabagismo entre as mulheres com margens livres que eram HR-HPV positivas ou negativas em seis meses. Nenhuma das variáveis analisadas diferiu significativamente entre os dois grupos.

Tabela 5. Distribuição das variáveis idade, paridade, tempo entre menarca e sexarca e tempo de tabagismo entre as mulheres com margens livres, segundo o grupo de risco do HPV em seis meses.

		Alto Risco (N=27)	Baixo Risco/Negativa (N=91)	p-valor
Idade	Média \pm σ	32,93 \pm 11,28	35,90 \pm 10,45	0,205
	Amplitude	18-54	18-56	
Paridade	Média \pm σ	2,30 \pm 1,67	2,19 \pm 1,5	0,754
	Amplitude	0-7	0-8	
Sexarca - Menarca	Média \pm σ	3,22 \pm 3,03	4,18 \pm 3,01	0,151
	Amplitude	0-10	1-14	
Tempo de Tabagismo	Média \pm σ	16,73 \pm 14,64	16,87 \pm 11,72	0,973
	Amplitude	0-47	1,-42	

Na análise de associação das características epidemiológicas e clínicas com a presença de HR-HPV seis meses após o tratamento (Tabela 6) foi observado que mulheres que tiveram um tempo entre a menarca e a sexarca maior de 3 anos apresentaram uma probabilidade 52,0% menor de ter infecção por HR-HPV em 6 meses, do que mulheres que tiveram esse tempo menor ou igual a 3 anos (OR=0,48; IC 95% = 0,24 – 0,96).

Na Tabela 6 ainda é possível observar que em relação ao tabagismo, mulheres que fumaram por mais de 17 anos apresentaram um a probabilidade maior de apresentar infecção por HR-HPV do que mulheres que fumaram por 17 anos ou menos, e mulheres que fumaram mais de 2,5 pacotes-ano também apresentaram uma probabilidade maior de infecção por HR-HPV do que mulheres que fumaram 2,5 ou menos pacotes-ano,

porém nenhuma das duas variáveis mostrou significância estatística (RC = 1,78; IC 95% = 0,68 - 4,63; RC = 1,77; IC 95% = 0,54 - 5,81, respectivamente).

Tabela 6. Distribuição do risco de apresentar infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento.

Variável	Bruta	Razões de Chances		
		IC 95%	Ajustada [§]	IC 95%
Cor				
Branca	1,00		1,00	
Parda	0,88	(0,42 - 1,88)	0,90	(0,42 - 1,93)
Negra	1,13	(0,44 - 2,88)	1,11	(0,43 - 2,83)
Paridade				
0-1	1,00		1,00	
2-3	1,37	(0,64 - 2,96)	1,43	(0,56 - 3,11)
>3	1,35	(0,52 - 3,48)	1,54	(0,57 - 4,17)
Nº Parceiros				
1-2	1,00		1,00	
3-4	1,68	(0,78 - 3,63)	1,64	(0,75 - 3,55)
>=5	0,45	(0,18 - 1,09)	0,44	(0,18 - 1,07)
Sexarca – Menarca				
<= 3 anos	1,00		1,00	
> 3 anos	0,48	(0,24 – 0,96)*	0,48	(0,23 - 0,99) *
Uso de CO				
Não	1,00		1,00	
Ex-usuária	0,91	(0,35 - 2,37)	0,89	(0,34 - 2,32)
Sim	0,93	(0,37 - 2,36)	0,98	(0,33 - 2,95)
Tempo de uso de CO				
<= 10 anos	1,00		1,00	
> 10 anos	0,70	(0,29 - 1,67)	0,68	(0,28 - 1,64)
Tabagismo				
Nunca	1,00		1,00	
Ex-tabagista	0,76	(0,35 - 1,68)	0,66	(0,27 - 1,57)
Atual	0,70	(0,30 - 1,62)	0,84	(0,39 - 1,84)
Tempo de Tabagismo				
<= 17 anos	1,00		1,00	
> 17 anos	1,78	(0,68 - 4,63)	1,78	(0,62 - 5,11)
Pacotes -ano				
<= 2,5	1,00		1,00	
> 2,5	1,77	(0,54 - 5,81)	1,71	(0,49 - 5,09)
Citologia				
LBG	1		1,00	
LAG	1,32	(0,58 - 3,00)	1,27	(0,56 - 2,92)
Margem Endocervical				
Livre	1,00		1,00	
Comprometida	2,14	(0,82 - 5,56)	2,10	(0,81 - 5,47)

[§]Razões de Chances ajustadas por idade.

A análise das margens mostrou que mulheres com margem endocervical comprometida apresentaram uma maior probabilidade de ter infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento do que mulheres que não tinham a margem endocervical comprometida (RC = 2,14; IC 95% = 0,82 - 5,56), apesar da associação não ter se mostrado estatisticamente significativa.

Controlando o efeito da idade no tempo entre a menarca e a sexarca, essa variável continuou mostrando uma probabilidade menor de infecção por HR-HPV em seis meses quando esse tempo foi maior do que 3 anos (RC = 0,48; IC 95% = 0,23 - 0,99) (Tabela 6).

6.3 – Descrição da infecção por HPV dois anos após o tratamento

Aos 2 anos após o tratamento, das mesmas 290 mulheres tratadas, 199 (68,6%) possuíam amostra de *swab* cervical, perfazendo um total de 31,4% de perdas. Essas amostras também foram submetidas às técnicas de extração do DNA das células cervicais, detecção do DNA viral e avaliação da qualidade do DNA genômico. Nesse grupo, 24 amostras (12,1%) não amplificaram para nenhum dos três pares de *primers* sendo excluídas das análises pelos motivos já citados. As frequências da idade, cor e citologia das pacientes excluídas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas do restante do grupo avaliado.

Assim, 175 (60,3%) pacientes puderam ter o status da infecção por HPV identificado. Deste total, 41 (23,4%) das mulheres apresentaram positividade para o DNA de HPV. Essas amostras também foram sequenciadas para identificação do tipo de HPV presente na amostra de cada paciente e classificação dos tipos em baixo ou alto risco oncogênico. Devido a pouca quantidade de material amplificado, não foi possível obter um resultado satisfatório na análise do sequenciamento de 5 (12,2%) das mulheres avaliadas. Ao serem submetidas à etapa de amplificação do DNA viral para um segundo processo de sequenciamento, os fragmentos não foram amplificados sem razões aparentes que justificassem. Essas amostras foram excluídas das análises. Os tipos encontrados nas 36 (87,8%) amostras com sequenciamento satisfatório estão apresentados na Tabela 7. Dentre as 36 mulheres positivas para o HPV, 86,1% apresentaram infecções por HR-HPV. O tipo mais frequente também foi o HPV 16 que se encontrava presente em 12 (33,3%), seguido do tipo 58 (13,9%).

Tabela 7. Distribuição dos tipos de HPV encontrados 2 anos após o tratamento.

Tipo HPV	N (%)
Tipo	
Alto Risco	31 (86,1)
16	12 (33,3)
18	2 (5,6)
31	1 (2,8)
33	1 (2,8)
45	3 (8,3)
52	1 (2,8)
53	1 (2,8)
56	1 (2,8)
58	5 (13,9)
59	3 (8,3)
66	1 (2,8)
Baixo Risco	5 (13,9)
81	2 (5,6)
84	1 (2,8)
89	2 (5,6)

6.3.1 - Prevalência da infecção por HR-HPV e fatores associados

As pacientes positivas para LR-HPV também foram agrupadas com as mulheres negativas para HPV, compondo o grupo de comparação do estudo. Desta forma, 31 (18,2%) das 170 pacientes apresentaram positividade para infecção por HR-HPV dois anos após o tratamento. A positividade para HR-HPV nas pacientes em 2 anos, de acordo com as variáveis epidemiológicas e clínicas, estão apresentados na Tabela 8.

Das mulheres que eram HR-HPV positivas em 6 meses, 37,0% também apresentaram positividade para HR-HPV dois anos após o tratamento, enquanto apenas 12,0% das mulheres que eram negativas em 6 meses apresentaram positividade em 2 anos. Dentre as mulheres com margens livres, 17 (17,2%) apresentaram positividade para HR-HPV dois anos após o tratamento. Em relação à carga tabágica, 19,4% das mulheres que fumaram mais de 2,5 pacotes-ano eram HR-HPV positivas 2 anos após o tratamento comparado com apenas 5% de positividade para HR-HPV entre as mulheres que fumaram 2,5 ou menos pacotes-ano. Analisando o comprometimento endocervical

das margens, 17,3% das mulheres com margens endocervicais livres apresentaram positividade para HR-HPV dois anos após o tratamento comparado a 29,4% de mulheres HR-HPV positivas no grupo das mulheres que tinham margens endocervicais comprometidas.

Tabela 8. Distribuição das características epidemiológicas e clínicas, segundo o grupo de risco do HPV.

Variável	HPV		P-valor
	Alto Risco	Baixo Risco/Negativa	
Idade			
18-28	15 (27,8)	39 (72,2)	0,089
29-45	11 (14,1)	67 (85,9)	
>45	5 (13,2)	33 (86,8)	
Cor			
Branca	9 (19,1)	38 (80,9)	0,695
Parda	18 (19,6)	74 (80,4)	
Negra	4 (12,9)	27 (87,1)	
Paridade			
0-1	12 (22,2)	42 (77,8)	0,525
2-3	15 (17,9)	69 (82,1)	
>3	4 (12,5)	28 (87,5)	
Nº Parceiros			
1-2	15 (24,6)	46 (75,4)	0,274
3-4	8 (15,1)	45 (84,9)	
>=5	8 (14,3)	48 (85,7)	
Menarca			
<= 13 anos	18 (17,5)	85 (82,5)	0,750
> 13 anos	13 (19,4)	54 (80,6)	
Sexarca			
<= 15 anos	11 (19,0)	47 (81,0)	0,859
> 15 anos	20 (17,9)	92 (82,1)	
Sexarca – Menarca			
<= 3 anos	16 (18,4)	71 (81,6)	0,957
> 3 anos	15 (18,1)	68 (81,9)	
Uso de CO			

Não	7 (28,0)	18 (72,0)	
Ex-usuária	19 (17,8)	88 (82,2)	0,321
Atual ou Ex-usuária	5 (13,2)	33 (86,8)	
Tempo de uso de CO			
<= 10 anos	16 (15,0)	91 (85,0)	
> 10 anos	8 (22,2)	28 (77,8)	0,313
Tabagismo			
Nunca	17 (20,5)	66 (79,5)	
Ex-tabagista	9 (20,0)	36 (80,0)	0,471
Atual	5 (11,9)	37 (88,1)	
Tempo de Tabagismo			
<= 17 anos	6 (15,4)	33 (84,6)	
> 17 anos	8 (16,7)	40 (83,3)	0,871
Pacotes -ano			
<= 2,5	1 (5,0)	19 (95,0)	
> 2,5	13 (19,4)	54 (80,6)	0,124
Citologia			
LBG	8 (17,0)	39 (83,0)	
LAG	23 (18,7)	100 (81,3)	0,800
Margem			
Livre	17 (17,2)	82 (82,8)	
Comprometida	10 (22,2)	35 (77,8)	0,472
Margem Endocervical			
Livre	22 (17,3)	105 (82,7)	
Comprometida	5 (29,4)	12 (70,6)	0,230
HR-HPV em 6 meses			
Não	11 (12,0)	81 (88,0)	
Sim	10 (37,0)	17 (63,3)	0,003*

A Tabela 9 descreve a idade, a paridade, o tempo entre a menarca e a sexarca e o tempo de tabagismo entre as mulheres com margens livres que eram HR-HPV positivas ou negativas em 2 anos. Nenhuma das variáveis analisadas diferiu significativamente entre os dois grupos.

Tabela 9. Descrição das variáveis idade, paridade, tempo entre menarca e sexarca e tempo de fumo entre as mulheres com margens livres, segundo o grupo de risco do HPV em dois anos.

		Alto Risco	Baixo Risco/Negativas	p-valor
		(N=17)	(N=81)	
Idade	Média \pm σ	33,35 \pm 12,78	35,90 \pm 10,65	0,389
	Amplitude	18-53	18-57	
Paridade	Média \pm σ	1,59 \pm 1,77	2,47 \pm 1,67	0,053
	Amplitude	0-7	0-8	
Sexarca - Menarca	Média \pm σ	3,76 \pm 2,36	3,84 \pm 3,03	0,924
	Amplitude	0-9	0-14	
Tempo de Tabagismo	Média \pm σ	17,00 \pm 11,11	16,60 \pm 12,51	0,946
	Amplitude	4-29	0-47	

Na análise de associação das características epidemiológicas e clínicas com a presença de HR-HPV dois anos após o tratamento (Tabela 10) foi observado que mulheres que tinham um HR-HPV seis meses após o tratamento tiveram uma probabilidade 4,33 vezes maior (IC 95% = 1,59 - 11,81) de apresentar infecção por HR-HPV em dois anos do que as mulheres que não tinham HR-HPV seis meses após o tratamento. Em relação ao tabagismo, as mulheres que fumaram mais de 2,5 pacotes-ano tiveram uma probabilidade 4,57 vezes maior de ser HR-HPV positiva do que as mulheres que fumaram 2,5 pacotes-ano ou menos, apesar de não ter obtido significância estatística (IC 95% = 0,56 - 37,36).

Tabela 10. Estimativas das razões de chances brutas e ajustadas relacionadas à infecção por HR-HPV dois anos após o tratamento.

Variável	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95%	Ajustada[§]	IC 95%
Cor				
Branca	1,00		1,00	
Parda	1,03	(0,42 - 2,50)	1,08	(0,44 - 2,65)
Negra	0,63	(0,17 - 2,24)	0,61	(0,17 - 2,20)
Paridade				
0-1	1,00		1,00	
2-3	0,76	(0,33 - 1,78)	0,92	(0,38 - 2,24)
>3	0,50	(0,15 - 1,71)	0,70	(0,19 - 2,58)
Nº Parceiros				
1-2	1,00		1,00	
3-4	0,55	(0,21 - 1,41)	0,52	(0,20 - 14,37)

>=5	0,51	(0,20 - 1,32)	0,53	(0,20 - 1,38)
Menarca				
<= 13 anos	1,00		1,00	
> 13 anos	1,14	(0,52 - 2,51)	1,29	(0,57 - 2,91)
Sexarca				
<= 15 anos	1,00		1,00	
> 15 anos	0,93	(0,41 - 2,10)	1,19	(0,50 - 2,83)
Sexarca - Menarca				
<= 3 anos	1,00		1,00	
> 3 anos	0,98	(0,45 - 2,13)	1,21	(0,54 - 2,73)
Uso de CO				
Não	1,00		1,00	
Ex-usuária	0,56	(0,20 - 1,52)	0,51	(0,18 - 1,42)
Atual ou Ex-usuária	0,51	(0,19 - 1,36)	0,44	(0,12 - 1,61)
Tempo de uso de CO				
<= 10 anos	1,00		1,00	
> 10 anos	1,63	(0,63 - 4,20)	1,88	(0,69 - 5,11)
Tabagismo				
Nunca	1,00		1,00	
Ex-tabagista	0,97	(0,39 - 2,40)	0,66	(0,22 - 2,00)
Atual	0,53	(0,18 - 1,54)	1,18	(0,46 - 3,02)
Tempo de Tabagismo				
<= 17 anos	1,00		1,00	
> 17 anos	1,10	(0,35 - 3,49)	1,30	(0,33 - 5,05)
Pacotes -ano				
<= 2,5	1,00		1,00	
> 2,5	4,57	(0,56 - 37,36)	6,67	(0,72 - 61,64)
Citologia				
LBG	1,00		1,00	
LAG	1,12	(0,46 - 2,72)	1,05	(0,43 - 2,57)
Margem Endocervical				
Livre	1,00		1,00	
Comprometida	1,99	(0,64 - 6,22)	2,17	(0,68 - 6,89)
HR-HPV em 6 meses				
Não	1,00		1,00	
Sim	4,33	(1,59 - 11,81)*	4,27	(1,54 - 11,82)*

§ Razões de Chance ajustadas por idade.

Controlando o efeito da idade na probabilidade de ser HR-HPV em 2 anos sendo HR-HPV positiva em seis meses, essa variável continuou apresentando uma maior probabilidade de ser HR-HPV positiva em dois anos para as mulheres que eram HR-HPV positivas em seis meses (RC = 4,27; IC 95% = 1,54 – 11,82). O número de pacotes-ano mostrou uma RC = 6,67 vezes maior para mulheres que fumaram mais de

2,5 pacotes-ano quando comparadas às que fumaram menos de 2,5 pacotes-ano, porém continuou sem apresentar significância estatística (IC 95% = 0,72 – 61,64).

6.4 – Análise da persistência por tipo viral de HR-HPV

Cento e vinte e quatro mulheres possuíam amostra em 6 meses e em 2 anos de acompanhamento. Em 5 (4,0%) delas não foi possível detectar o tipo de HPV presente restando 119 amostras com informação sobre presença de HR-HPV em seis meses e em dois anos de seguimento. Dentre as 91 (76,5%) mulheres que não apresentavam infecção por HR-HPV em 6 meses, 11 (12,1%) delas apresentaram uma nova infecção por HR-HPV em dois anos. Das 28 (23,5%) mulheres que apresentavam positividade para HR-HPV em 6 meses, 18 (64,3%) não apresentavam mais a infecção 2 anos após o tratamento, 7 (25,0%) apresentavam outro tipo de HR-HPV e 3 (10,7) apresentavam o mesmo tipo de HR-HPV.

Considerando as 91 pacientes negativas para HR-HPV em 6 meses, as 18 pacientes que negataram em 2 anos e as 7 pacientes que apresentavam em 2 anos um tipo de HR-HPV diferente do presente em seis meses, 116 (97,5%) das 119 pacientes não apresentavam em 2 anos a mesma infecção que causou a lesão inicial. Apenas 3 (2,5%) pacientes apresentavam o mesmo tipo de HR-HPV em 6 meses e em 2 anos (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos tipos de HPV encontrados nas 21 pacientes positivas para HR-HPV em 2 anos que possuíam informação sobre 6 meses após o tratamento.

Amostra N=21	6 meses	2 anos
T-6	Neg	16
T-18	16	45
T-23	53	53
T-26	58	58
T-32	Neg	16
T-36	Neg	59
T-39	Neg	58
T-56	Neg	16
T-60	58	16
T-68	Neg	16
T-73	Neg	16
T-74	35	59
T-132	35	31
T-133	Neg	18
T-135	Neg	18
T-151	Neg	16
T-173	31	66
T-194	Neg	16
T-202	31	52
T-264	51	58
T-449	45	45

6.5 – Falhas de tratamento

6.5.1 – Descrição e tipos de HPV encontrados

Das 210 pacientes que completaram o seguimento, 13 (6,2%) apresentaram nova alteração colpocitológica sendo necessária implementação de uma nova CAF. Na avaliação histológica do material retirado houve confirmação da presença NIC no tecido permitindo que essas mulheres fossem classificadas como falhas de tratamento, segundo os critérios definidos *a priori*. O resultado histológico no segundo tratamento está apresentado na Tabela 12. Oito (61,5%) das 13 falhas apresentavam margens comprometidas no primeiro tratamento, sendo que quatro (30,8%) delas apresentavam

comprometimento endocervical. Das 140 pacientes com margens livres, cinco (3,6%) apresentou falha de tratamento durante o seguimento. O tempo médio entre o tratamento e a falha foi de aproximadamente 20 meses.

Dessas 13 falhas, três foram consideradas como *missing* para o tipo viral, a primeira por não possuir material para detecção do HPV, a segunda por estar com o material degradado impossibilitando a amplificação dos fragmentos na PCR e a terceira amostra que amplificou para HPV, mas o resultado do sequenciamento não foi satisfatório para identificação do tipo viral e, ao repetir a PCR, não ocorreu novamente a amplificação do material.

Os tipos de HPV presentes nas dez falhas estão indicados na Tabela 12. Foram identificados sete tipos de HPV nas dez amostras. Infecções pelos HPV 16, 35 e 58 foram encontradas na mesma proporção de 20%, sendo duas amostras infectadas por cada um desses tipos. Os tipos 51, 53 e 82 foram encontrados na mesma proporção de 10,0%, sendo uma amostra infectada por cada tipo. Foi identificado em uma amostra o tipo 11 classificado como HPV de baixo-risco oncogênico, o resultado foi repedido três vezes e confirmado.

Tabela 12. Descrição do resultado histológico da segunda CAF e distribuição dos tipos de HPV encontrados.

Amostra	Histologia na falha	Tipo HPV na falha
F-341	NIC I	11
F-238	NIC II	16
F-303	Adenocarcinoma <i>in situ</i>	16
F-285	NIC II	35
F-326	NIC III	35
F-121	NIC I	51
F-23	NIC I	53
F-40	NIC III/ <i>Ca in situ</i>	58
F-46	NIC II	58
F-420	NIC III	82
F-255	NIC I	-
F-282	NIC II	-
F-433	NIC I	-

6.5.2 – Risco de falha de tratamento

A análise do risco de falha do tratamento durante o período de 2 anos de seguimento foi realizada visando avaliar o efeito dos dois principais fatores associados à falha na literatura: a positividade para HPV no material das consultas de 3 e 6 meses de seguimento e utilizando a informação sobre o tipo de HPV (alto ou baixo risco) seis meses após o tratamento.

Através da análise de Kaplan Meier foi possível estimar a probabilidade condicional de falha de tratamento em 2 anos de seguimento segundo as variáveis selecionadas. O risco global para falha de tratamento em dois anos foi de 5,3% (Figura 1).

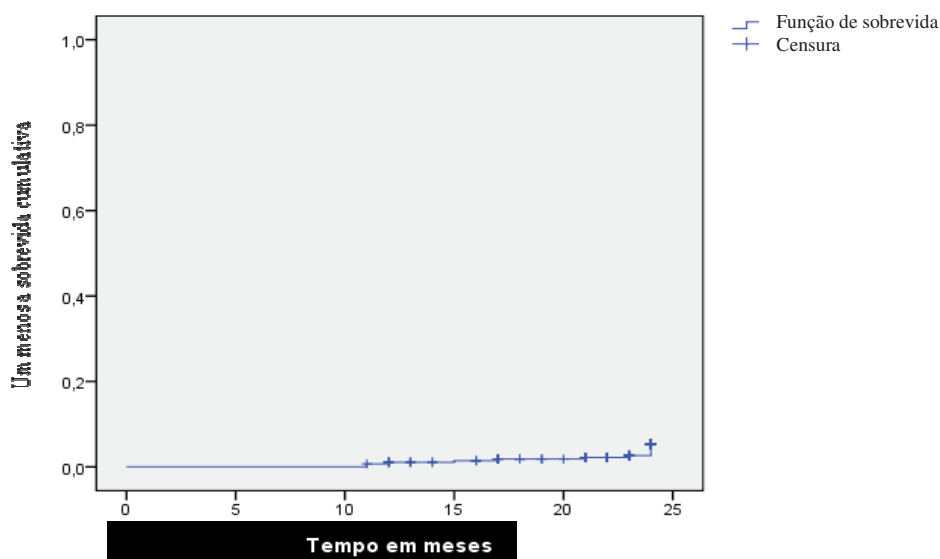


Figura 1. Risco global de falha de tratamento em 2 anos de seguimento

Na Tabela 13 estão apresentados os riscos de falha de acordo com a positividade por HPV entre três e seis meses após o tratamento de acordo com os critérios descritos *a priori*. É possível observar que o risco de falha para quem apresentou um resultado positivo (quando só havia uma informação) ou dois resultados positivos para HPV entre três e seis meses após o tratamento foi de 8,5%. Quanto à ausência de infecção por HPV, quem apresentou um resultado negativo (quando só havia uma informação disponível) ou dois resultados negativos para HPV entre três e seis meses após o tratamento teve um risco de falha de 0,8%.

Tabela 13. Risco de falha de tratamento em 2 anos de seguimento de acordo com as variáveis selecionadas.

Variável	% Falha	log rank 95%
HPV entre 3 e 6 meses		
Negativo	0,8	
Positivo	8,5	0,006*
Não avaliado	9,6	
HPV em 6 meses		
Negativo	0,0	
LR-HPV	0,0	
HR-HPV	17,0	0,001*
Não avaliado	4,9	
Margem Endocervical		
Livre	1,2	
Comprometida	11,7	0,046*
Margem		
Livre	1,6	
Comprometida	6,3	0,112
Pílula		
Nunca	3,9	
Ex-usuária	3,7	0,798
Atual	6,6	
Tabagismo		
Nunca	4,0	
Ex-tabagista	3,4	0,298
Atual	6,0	

Os resultados do risco de falha no tratamento avaliado por grupo de HPV encontrado seis meses após o tratamento estão apresentados na Tabela 13. Mulheres que apresentavam um HR-HPV seis meses após o tratamento tiveram um risco de falha de 17,0%. Enquanto o risco para mulheres negativas em seis meses e para mulheres com positividade para LR-HPV em 6 meses foi zero. Esse resultado também apresentou significância estatística. As demais variáveis foram testadas, porém não mostraram associação com o risco de falha.

A estimativa do risco relativo de falha de tratamento foi obtida através da regressão de Cox que revelou uma HR 12,25 vezes maior (IC 95% = 1,55 – 96,91) para mulheres que apresentavam infecção por HPV entre três e seis meses após o tratamento comparado às que eram negativas. Também mostrou uma HR de 3,37 para mulheres que tinham margem endocervical comprometida comparadas às que tinham margem

endocervical livre, nesse caso o IC 95% apresentou um resultado *borderline* variando de 0,95 a 11,99 (Tabela 14).

Tabela 14. *Hazard Ratio* de falha de tratamento em dois anos de seguimento segundo positividade para HPV e comprometimento da margem endocervical.

Variável	HR	IC 95%
HPV entre 3 e 6 meses		
Negativa	1,00	
Positiva	12,86	(1,63 - 101,51)*
Não avaliado	14,59	(1,18 - 108,99)*
Margem Endocervical		
Livre	1,00	
Comprometida	3,37	(0,95 - 11,99)

7 – Discussão

Atualmente a literatura tem dado destaque aos estudos que buscam identificar fatores de risco que conferem às mulheres uma maior probabilidade de apresentar uma infecção por HR-HPV após o tratamento ou de falha no tratamento. A presença de HR-HPV durante o seguimento preconizado de 2 anos destas mulheres tratadas sugere ser o principal fator de risco para a falha de tratamento (Leguevaque et al, 2010). Este aumento do risco de desenvolvimento de uma NIC durante o seguimento, em mulheres que são HR-HPV positivas após o tratamento, tem levado a proposta de inserção de testes que detectem a infecção por HR-HPV durante o seguimento (Leguevaque et al, 2010; Nobbenhuis et al, 2001; Alonso et al, 2006; Chan et al, 2009).

Em concordância com os achados da literatura, o presente estudo identificou um aumento significativo no risco de falha de tratamento para mulheres que apresentavam infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento. Leguevaque e colaboradores (2010), em um estudo de coorte retrospectivo realizado na França, que incluiu 352 mulheres tratadas para NIC entre 1999 e 2002, encontraram um aumento de 38,8 (IC 95% = 14,09 – 107,05) no risco de apresentar falha de tratamento para mulheres HR-HPV positivas seis meses após o tratamento. A diferença entre os valores encontrados pelo presente estudo e pelos estudos citados se dá pelas diferentes análises estatísticas realizadas. Enquanto no presente estudo foi possível avaliar o risco de falha através da regressão de Cox, levando em consideração o momento exato em que a falha ocorreu, nos estudos citados foi realizada a estimativa do risco de falha de tratamento através do cálculo da RC.

Já Paraskevaidis e colaboradores (2000), em um estudo caso-controle feito no reino Unido comparando 41 pacientes que apresentaram falha de tratamento com 82 pacientes que não falharam, encontraram um risco ainda maior, de 52,7 (IC 95% = 13,90 – 200,30), de apresentar falha de tratamento para mulheres HR-HPV positivas na primeira consulta após o tratamento (tempo médio de 4,2 meses).

Outro fator apontado na contribuição para positividade para HR-HPV após o tratamento e para falha de tratamento é o comprometimento das margens cirúrgicas. Para avaliar o status das margens como preditor de falha de tratamento, vários estudos tem sido realizados. Lubrano e colaboradores (2012) relataram um maior risco de falha de tratamento em mulheres com margens cirúrgicas comprometidas. Boonkit e colaboradores (2008) encontraram um risco maior de falha de tratamento quando havia

o comprometimento da margem endocervical. No presente estudo foi observada uma maior probabilidade de falha de tratamento em 2 anos para mulheres com margens endocervicais comprometidas, porém esse intervalo ficou *borderline*, sugerindo a possibilidade de apresentar significância estatística nesse resultado em um estudo com um maior tamanho amostral (HR = 3,37; IC95% = 0,95 - 11,99).

Nossos resultados estão de acordo com um estudo realizado por Ghaem-Maghani e colaboradores (2010) que encontraram um aumento de 7,9% no risco de falha cinco anos após o tratamento, em mulheres com margens endocervicais comprometidas, comparado a mulheres com margens livres. A diferença entre a Hazard Ratio (HR) encontrada no presente estudo e a encontrada por Ghaem-Maghani pode ser explicada pelas categorias de referências utilizadas, já que em nosso estudo comparamos mulheres com margens endocervicais comprometidas com mulheres com margens endocervicais livres, incluindo neste último grupo mulheres com margens ectocervicais comprometidas. Este fato pode ter reduzido a magnitude da associação observada.

Uma possível explicação para a associação entre o status das margens cirúrgicas e a falha no tratamento das NICs seria o fato de que as margens comprometidas teriam a presença de lesão precursora residual e, conseqüentemente, infecção persistente de HR-HPV (Paraskevaidis et al, 2000). No entanto, no presente estudo foi observada uma associação positiva entre o comprometimento das margens endocervicais e a positividade para HR-HPV em seis meses e em dois anos, mas esses achados não foram estatisticamente significativos.

Apesar das evidências de aumento do risco de falha para mulheres com margens comprometidas, não existe consenso quanto à avaliação das margens como um bom fator preditor para a falha no tratamento. Uma vez que mulheres que apresentam margens livres podem não estar necessariamente livres da infecção por HR-HPV, nem do risco de falha. Estudos realizados apenas com pacientes que apresentavam margens livres (Nam et al, 2009; Song et al, 2006) mostraram que uma parcela destas mulheres, aproximadamente 18%, ainda apresentava infecção por HR-HPV após o tratamento e falha de tratamento durante o seguimento.

Nossos achados mostram que aos seis meses após o tratamento, 22,7% da pacientes com margens livres apresentavam infecção por HR-HPV e que 3,6% das pacientes que possuíam margens livres apresentaram falha no tratamento em dois anos de seguimento. Alonso e colaboradores (2006), em um estudo de coorte realizado em

Barcelona, com 203 mulheres tratadas para NIC2/3, observaram uma proporção de 11,8% de falha no tratamento entre as mulheres que apresentavam margens livres. Este achado corrobora os demais achados da literatura que chamam atenção para a possibilidade de falha de tratamento mesmo em mulheres com margens livres. Estes resultados reforçam a necessidade do acompanhamento preconizado após o tratamento da NIC para todas as mulheres, pois mesmo aquelas com margens livres ainda estão a risco de falha.

Nossos achados revelaram que aos seis meses após o tratamento da NIC, 24,7% das pacientes ainda estavam infectadas por HR-HPV. Este resultado está de acordo com a literatura que mostra que em aproximadamente um terço das mulheres tratadas para NIC ainda apresentam infecção persistente por HR-HPV seis meses após o tratamento. Esses estudos mostram um risco de infecção por HR-HPV variando de 20-35% aos 6 meses após o tratamento (Alonso et al, 2006; Leguevaque et al, 2010; Kreimer et al, 2007; Bekkers et al, 2002).

A maioria dos estudos que avalia HPV após o tratamento não utiliza técnicas que diferenciem especificamente o tipo de HPV presente na amostra. As técnicas usadas identificam a presença ou ausência de DNA de HPV, de um grupo estabelecido de tipos virais, que foram selecionados para serem identificados nas amostras (Nagai et al, 2000; Alonso et al, 2006; Heymans et al, 2011).

Heymans e colaboradores (2011), em um estudo caso-controle realizado na Bélgica, avaliando os tipos de HPV presentes seis meses após o tratamento encontraram os tipos de HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 em suas amostras. Comparado aos tipos de HPV encontrados em nosso estudo, em período similar após o tratamento, foi identificada a presença dos mesmos tipos, exceto pelos tipos 33, 39 e 56. Ademais foram encontrados os tipos 70 e 82 que não foram relatados por Heymans.

Quanto às técnicas para detecção de HPV nos dois estudos, Heymans e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de PCR tipo-específica para 18 tipos de HPV, e o presente estudo utilizou a técnica de *nested* PCR com posterior sequenciamento das amostras, técnica esta que aumenta o espectro de tipos de HPV detectados (Meiring et al, 2012).

Nagai e colaboradores (2000) encontraram uma proporção de 19,0% de infecções por HR-HPV três meses após o tratamento. Os tipos de HPV encontrados foram: 16, 18, 33 e 58, mas a técnica utilizada se limitava a cinco tipos de HR-HPV

testados nas amostras. Em cinco das onze pacientes com infecção por HPV três meses após o tratamento, não foi identificado o tipo de HPV presente.

O presente estudo também mostrou que mulheres que tem um tempo maior entre a primeira menstruação e o início da atividade sexual apresentam uma probabilidade menor de apresentar positividade para infecção por HR-HPV seis meses após o tratamento. Esse achado pode ser analisado sob a perspectiva do processo de maturação do colo do útero. Quanto maior o tempo entre a menarca e a sexarca, maior será o tempo disponível para possibilitar a maturação completa do colo do útero. Quando o início da atividade sexual ocorre antes que esse processo seja concluído, há uma maior exposição das células metaplásicas, que estão em plena diferenciação, às infecções por HPV. A replicação e diferenciação das células da zona de transformação são o ambiente ideal para a estabilização da infecção por HPV. Com o ambiente favorável, as infecções que acontecem na fase de maturação do colo são mais prováveis de tornarem-se persistentes (Hwang et al, 2009).

No presente estudo, a positividade para HR-HPV aos dois anos foi de 18,2%. Essa proporção foi maior do que a de 8,1% encontrada por Aerssens e colaboradores (2009), em período seguimento similar. Ainda neste estudo, os autores encontraram que, comparando o tipo de HR-HPV antes do tratamento com os tipos encontrados na investigação durante o seguimento, 4,5% das pacientes apresentaram persistência da infecção durante o seguimento, nesse caso, o mesmo tipo de HPV foi identificado em todas as consultas de seguimento, 1,5% re-infectaram com o mesmo tipo de HR-HPV e 7,5% re-infectaram com um tipo diferente de HR-HPV. No presente estudo, não foi possível identificar se a infecção por HPV após o tratamento ocorreu pelo mesmo tipo de HPV presente no momento do tratamento, dado que não foi possível determinar os tipos de HPV presentes no momento do tratamento. Porém uma vez que está claramente definido na literatura que a infecção por HR-HPV é uma causa necessária para o desenvolvimento da lesão, é possível assumir que todas as mulheres tratadas apresentavam infecção por HPV na NIC e, portanto, pode-se considerar a persistência da positividade da infecção por HPV (Muñoz et al, 2006).

Apesar de não ter sido possível determinar a persistência do tipo viral antes e depois do tratamento, nosso estudo conseguiu avaliar a persistência do tipo de HR-HPV de seis meses e para dois anos após o tratamento. Sendo assim, 3 (2,5%) das 119 pacientes com informação da positividade em seis meses e em dois anos apresentavam o mesmo tipo de HR-HPV ao final do seguimento. Dezoito pacientes (15,2%) puderam

ser consideradas como re-infecções por não apresentarem infecção por HR-HPV em seis meses, ou por apresentarem um tipo de alto-risco diferente.

A positividade para HR-HPV em seis meses apresentou um aumento significativo no risco de apresentar uma infecção por HR-HPV em dois anos (RC = 4,27; IC 95% = 1,54 – 11,82). Independente de ser a mesma ou uma nova infecção, essas pacientes ainda estão sob alto risco de desenvolverem outra NIC e necessitam de atenção por ainda estarem expostas ao principal fator de risco para o reaparecimento da lesão mesmo aos dois anos após o tratamento (Ramos, 2008).

Diferente dos achados de Sarian e colaboradores (2004) e Acladius e colaboradores (2002), nosso estudo não encontrou associação estatisticamente significativa entre o tabagismo e a positividade para HR-HPV ou falha de tratamento.

No presente estudo 6,2% das mulheres apresentaram falha de tratamento em 2 anos de seguimento. Resultados semelhantes foram encontrados na Coreia e na Bélgica, onde foram observados riscos de falha no tratamento das NIC de 6,6% (Park et al, 2009; Ryu et al, 2012) e de 7,5% (Aerssens et al, 2009), respectivamente. Por outro lado, nos estudos realizados na Holanda e na Espanha foram observados riscos maiores de falha no tratamento de 11% (Bekkers et al, 2002) e de 17,7% (Alonso et al, 2006), respectivamente. Em todos os estudos citados a definição de falha no tratamento também foi a confirmação histopatológica de NIC e foram desenvolvidos num período de seguimento de 2 anos.

Em média, a maioria dos estudos encontraram que o tempo entre o tratamento e a falha ocorreu entre 5 e 29 meses (Park et al, 2006; Alonso et al, 2006; Kreimer et al, 2007; Leguevaque et al, 2010). Corroborando com esses achados, o tempo médio entre o tratamento e a falha no presente estudo foi de 20 meses, indicando que durante os 24 meses que se seguem após o tratamento a probabilidade de falha é relativamente alta.

Desta forma, nossos achados apontam para a importância do seguimento de dois anos após o tratamento devido ao risco aumentado de desenvolvimento do câncer cervical em mulheres tratadas para NIC (Strander et al, 2007). Visando otimizar o padrão de seguimento das mulheres tratadas para NIC, a investigação da positividade para HR-HPV após o tratamento permite selecionar o grupo de mulheres com maior probabilidade de falha possibilitando o estabelecimento de uma vigilância colposcópica em intervalos de tempo menor. Por outro lado, a identificação da ausência de infecção por HR-HPV permite aumentar o intervalo de seguimento de

mulheres com baixo risco de desenvolver uma nova lesão (Park et al, 2009; Paranskevaidis et al, 2000).

A presença do HPV 11 na amostra de uma paciente que apresentou falha de tratamento chamou a atenção, pelo fato de se tratar de um HPV de baixo-risco oncogênico. Uma possível explicação para esse resultado poderia ser uma co-infecção por um tipo de alto-risco, porém os eletroferogramas dos 3 sequenciamentos realizados não apresentarem indícios de co-infecção.

A presença de LR-HPV em NIC 1 é estimada em cerca de 15% e em geral ocorre regressão espontânea dessas lesões (Alonso et al, 2007). Porém como essa lesão ocorreu após o tratamento, e mulheres tratadas apresentam um risco maior de desenvolvimento do câncer cervical do que a população geral, essa lesão foi novamente retirada em vez de ser acompanhada. Infelizmente não foi possível acessar a presença nem o tipo de HPV presente nessa paciente no primeiro tratamento, nem 6 meses após o primeiro tratamento.

Um estudo realizado por González-Bosquet (2006) descreveu um caso de uma mulher de 32 anos que possuía apenas o HPV 6, outro HPV de baixo-risco, em sua amostra de câncer cervical. Essa paciente havia sido tratada para lesão de baixo grau e apresentou citologia normal seis meses após o tratamento. Na citologia seguinte, 12 meses após o tratamento, foi diagnosticada uma lesão de alto grau. Após a retirada da nova lesão foi obtido o resultado histológico de câncer cervical escamoso invasor e lesão de alto grau nas margens. Esse estudo sugeriu uma re-avaliação do atual prognóstico favorável tanto para as lesões de baixo grau quanto para os tipos de HPV de baixo risco, uma vez que foi encontrado um HPV de baixo risco em uma amostra de câncer cervical.

Uma das vantagens desse estudo foi a utilização da técnica de *nested* PCR PGMV/GP+ que apresenta uma alta sensibilidade para detecção de um número baixo de cópias virais, além de possuir um espectro amplo de tipos detectados (Haws et al, 2004). Além disso, por se tratar de um estudo exploratório dentro de uma coorte hospitalar, foi possível a realização de um estudo transversal em dois momentos dentro da coorte, permitindo a investigação da positividade para HR-HPV nas pacientes em 6 meses e em 2 anos após o tratamento, além da análise prospectiva do risco de falha de tratamento.

Uma das limitações desse estudo foi a alta proporção de pacientes sem amostras de seguimento em 6 meses e 2 anos. Essa falta de *swab* não está apenas relacionada à perda das pacientes durante o seguimento (10%), mas também ao fato de, muitas vezes,

as pacientes irem à consulta, porém o *swab* cervical do exame colpocitológico não ter sido coletado pelo médico para posterior detecção do HPV. No entanto, considerando que os médicos não sabiam o resultado da citologia no momento da consulta e que o perfil das mulheres sem *swab* não diferiu das mulheres que tinham *swab*, podemos assumir que as perdas não foram diferenciais neste estudo.

8 – Conclusão

O presente estudo mostrou que após o tratamento das lesões precursoras do câncer cervical ainda há uma alta proporção de mulheres infectadas por HR-HPV tanto em 6 meses (24,7%) quanto em 2 anos (18,2%) após o tratamento. Isso significa que, mesmo tratadas, elas ainda estão sob risco aumentado de apresentar novamente lesões durante o seguimento, que podem progredir para o câncer cervical. Por outro lado, mesmo mulheres com margens cirúrgicas livres têm um alto percentual de HR-HPV (22,7%) e apresentam falha no tratamento (3,6%). Além disso, nossos achados sugerem que a identificação do tipo de HPV após o tratamento pode servir como ferramenta para identificar mulheres com maior risco de falha de tratamento, visto que as mulheres positivas para HR-HPV entre três e seis meses após o tratamento podem aumentar significativamente o risco de falha em dois anos de seguimento.

Os achados do presente estudo reforçam a importância do seguimento adequado das pacientes após o tratamento para detectar as possíveis falhas e tratá-las conforme necessário, interrompendo o progresso da doença.

Este estudo ainda mostrou a importância de identificação do tipo de HPV após o tratamento como ferramenta para identificar mulheres com maior risco de falha de tratamento.

9 - Considerações finais

Apesar de apenas uma pequena proporção das mulheres infectadas por HPV de fato desenvolver o câncer cervical, as taxas de incidência e mortalidade por esta neoplasia ainda são elevadas, assumindo grande relevância no cenário nacional e mundial.

Desta forma, é possível reafirmar a necessidade do tratamento e seguimento adequado das mulheres que conseguem ter acesso aos serviços de saúde. É de extrema importância que as mulheres com lesões precursoras que chegam ao tratamento sejam acompanhadas adequadamente para que não evoluam para o estágio de câncer cervical.

Devido à necessidade de um período de seguimento das pacientes tratadas, é fundamental identificar o grupo com maior risco de falhar no tratamento, para que possam ser feitos esforços no sentido de garantir a adesão ao seguimento deste grupo, garantindo o acompanhamento correto e impedindo a evolução da doença.

Neste contexto a inclusão do teste para HR-HPV durante o seguimento, em conjunto com a citologia, pode ser uma ferramenta útil no seguimento das mulheres tratadas para NIC, pois podem contribuir na identificação das mulheres com maior risco de falha no tratamento. Enquanto pacientes positivas para HR-HPV poderiam ter um acompanhamento diferenciado por estarem sob maior risco de falha, as mulheres negativas para HR-HPV poderiam ter um acompanhamento com intervalos de tempo maiores, otimizando os recursos empregados no controle do câncer cervical e diminuindo as taxas de incidência e mortalidade por esta doença no país.

10 – Referências Bibliográficas

- Acladios NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchener H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer*. 2002 Mar 20;98(3):435-9.
- Aerssens A, Claeys P, Garcia A, Sturtewagen Y, Velasquez R, Vanden Broeck D, Vansteelandt S, Temmerman M, Cuvelier CA. Natural history and clearance of HPV after treatment of precancerous cervical lesions *Histopathology*. 2008 Feb;52(3):381-6. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02956.x.
- Aerssens A, Claeys P, Beerens E, Garcia A, Weyers S, Van Renterghem L, Praet M, Temmerman M, Velasquez R, Cuvelier CA. Prediction of recurrent disease by cytology and HPV testing after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Cytopathology*. 2009 Feb;20(1):27-35. doi: 10.1111/j.1365-2303.2008.00567.x.
- Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, Pahisa J, Ordi J. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol*. 2006 Nov;103(2):631-6. Epub 2006 Jun 14.
- Alonso I, Torné A, Puig-Tintoré LM, Esteve R, Quinto L, Garcia S, Campo E, Pahisa J, Ordi J. High-risk cervical epithelial neoplasia grade 1 treated by loop electrosurgical excision: follow-up and value of HPV testing. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Oct;197(4):359.e1-6. Epub 2007 Aug 21.
- Anderson GH, Boyes DA, Benedet JL, Le Riche JC, Matisic JP, Suen KC, Worth AJ, Millner A, Bennett OM. Organisation and results of the cervical cytology screening programme in British Columbia, 1955-85. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988 Apr 2;296(6627):975-8
- Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC Jr. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician*. 2003 Nov 15;68(10):1992-8.
- Ayres, Andréia Rodrigues Gonçalves, e Gulnar Azevedo e Silva. 2010. “Cervical HPV infection in Brazil: systematic review”. *Revista De Saúde Pública* 44 (5) (outubro): 963-974.
- Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical

- excision procedure. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Nov-Dec;17(6):1271-7. Epub 2007 Apr 18.
- Bekkers RL, Melchers WJ, Bakkers JM, Hanselaar AG, Quint WG, Boonstra H, Massuger LF. The role of genotype-specific human papillomavirus detection in diagnosing residual cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2002 Nov 10;102(2):148-51.
- Boonlikit S, Junghuttakarnsatit P, Asavapiriyant S. Treatment failure following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia at Rajavithi Hospital. *J Med Assoc Thai*. 2008 Jan;91(1):31-6.
- Bosch FX, Muñoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):183-90.
- Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebbali S, Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):2006-11. Epub 2007 Jul 19.
- Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol*. 2008 Winter;1(1):2-10.
- Brockmeyer AD, Wright JD, Gao F, Powell MA. Persistent and recurrent cervical dysplasia after loop electrosurgical excision procedure. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 May;192(5):1379-81.
- Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20-8.
- Chan BK, Melnikow J, Slee CA, Arellanes R, Sawaya GF. Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Apr;200(4):422.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2008.11.031.
- Ciuffo, G. (1907). Innesto positivo con filtrado di verruca volgare. *G. Ital. Mal. Venereol.*, 48, 12–17.
- Clarke B, Chetty R. Cell Cycle Aberrations in the Pathogenesis of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Gynecol Oncol* 2001; 82:238–246.
- Clifford, G M, S Gallus, R Herrero, N Muñoz, P J F Snijders, S Vaccarella, P T H Anh, et al. 2005. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer

- HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.
- Cox JT. Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1995 Mar;9(1):1-37.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995, 76:1057-1062.
- de Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer*. 2003 Mar 1;103(6):705-8.
- Derchain SFM, Filho AL, Syrjanen KJ. Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2005 vol.27 no.7.
- Ferenczy A, Choukroun D, Arseneau J. Loop electrosurgical excision procedure for squamous intraepithelial lesions of the cervix: advantages and potential pitfalls. *Obstet Gynecol*. 1996 Mar;87(3):332-7.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516.
- Fonseca FV, Tomasich FD, Jung JE. High-grade intraepithelial cervical lesions: evaluation of the factors determining an unfavorable outcome after conization. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011 Nov;33(11):334-40.
- Ghaem-Maghani S, De-Silva D, Tipples M, Lam S, Perryman K, Soutter W. Determinants of success in treating cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG*. 2011 May;118(6):679-84. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02770.x. Epub 2010 Nov 18.
- Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, Harri R, Baldwi S, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Inserra P. Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control*. 2002 Nov;13(9):839-46.
- González-Bosquet E, Muñoz A, Suñol M, Laila JM. Cervical cancer and low-risk HPV; a case report. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2006;27(2):193-4.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):357-61.

- Hamontri S, Israngura N, Rochanawutanon M, Bullangpoti S, Tangtrakul S. Predictive factors for residual disease in the uterine cervix after large loop excision of the transformation zone in patients with cervical intraepithelial neoplasia III. *J Med Assoc Thai.* 2010 Feb;93 Suppl 2:S74-80.
- Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R, Tying SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods.* 2004 Dec 1;122(1):87-93.
- Heymans J, Benoy IH, Poppe W, Depuydt CE. Type-specific HPV geno-typing improves detection of recurrent high-grade cervical neoplasia after conisation. *Int J Cancer.* 2011 Aug 15;129(4):903-9. doi: 10.1002/ijc.25745. Epub 2011 Feb 11.
- Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Feb 3;91(3):252-8.
- Hwang LY, Ma Y, Benningfield SM, Clayton L, Hanson EN, Jay J, Jonte J, Godwin de Medina C, Moscicki AB. Factors that influence the rate of epithelial maturation in the cervix in healthy young women. *J Adolesc Health.* 2009 Feb;44(2):103-10. doi: 10.1016/j.jadohealth.2008.10.006.
- IARC 2004, Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83, 1-1438.
- IARC 2013, Agents classified by the IARC monographs, volumes 1–107, Lyon, France. Last update: 10 April 2013. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- Jakus S, Edmonds P, Dunton C, King SA. Margin status and excision of cervical intraepithelial neoplasia: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 2000 Aug;55(8):520-7
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. Epub 2011 Feb 4.
- Karabulutlu O. Evaluation of the pap smear test status of Turkish women and related factors. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):981-6.
- Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, Angström T, Dillner J. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer.* 2000 Apr;82(7):1332-8.

- Kocken M, Helmerhorst TJ, Berkhof J, Louwers JA, Nobbenhuis MA, Bais AG, Hogewoning CJ, Zaal A, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):441-50.
- Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, Poole C, Jenkins D, Smith JS. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2008 Jul 15;168(2):123-37. Epub 2008 May 15.
- Kreimer AR, Guido RS, Solomon D, Schiffman M, Wacholder S, Jeronimo J, Wheeler CM, Castle PE. Human papillomavirus testing following loop electrosurgical excision procedure identifies women at risk for posttreatment cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 May;15(5):908-14.
- Kreimer AR, Katki HA, Schiffman M, Wheeler CM, Castle PE; ASCUS-LSIL Triage Study Group. Viral determinants of human papillomavirus persistence following loop electrical excision procedure treatment for cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jan;16(1):11-6.
- Leguevaque P, Motton S, Decharme A, Soulé-Tholy M, Escourrou G, Hoff J. Predictors of recurrence in high-grade cervical lesions and a plan of management. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Nov;36(11):1073-9. doi: 10.1016/j.ejso.2010.08.135. Epub 2010 Sep 27.
- Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcón JM, Leon L, Molina J, Falcón O. Follow-up after LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2-CIN 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012 Mar;161(1):71-4. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.11.023. Epub 2011 Dec 15.
- Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jun 16;(6):CD001318.
- Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T et al. P16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 2003;34(8):778-83.
- Mathevet P, Dargent D, Roy M, Beau G. A randomized prospective study comparing three techniques of conization: cold knife, laser, and LEEP. *Gynecol Oncol.* 1994 Aug;54(2):175-9.

- Meiring TL, Salimo AT, Coetzee B, Maree HJ, Moodley J, Hitzeroth II, Freeborough MJ, Rybicki EP, Williamson AL. Next-generation sequencing of cervical DNA detects human papillomavirus types not detected by commercial kits. *Virology*. 2012 Aug 16;9:164. doi: 10.1186/1743-422X-9-164.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa | 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
- Moore DH. Cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2006 May;107(5):1152-61.
- Moore EE, Danielewski JA, Garland SM, Tan J, Quinn MA, Stevens MP, Tabrizi SN. Clearance of human papillomavirus in women treated for cervical dysplasia. *Obstet Gynecol*. 2011 Jan;117(1):101-8. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182020704.
- Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.
- Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shiboski S. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol*. 2010 Dec;116(6):1373-80. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181fe777f.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol* 2004; 78(21):11451-11460.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27.
- Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10. Epub 2006 Jun 23.
- Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol*. 2000 Nov;79(2):294-9.

- Nam K, Chung S, Kim J, Jeon S, Bae D. Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *J Gynecol Oncol.* 2009 Jun;20(2):91-5. Epub 2009 Jun 29
- Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, Verheijen RH, Helmerhorst TJ. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 2001 Mar 23;84(6):796-801.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res.* 2008 Sep 23;7(3):861-71.
- Paraskevaïdis E, Lolis ED, Koliopoulos G, Alamanos Y, Fotiou S, Kitchener HC. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after large loop excision with clear margins. *Obstet Gynecol.* 2000 Jun;95(6 Pt 1):828-31.
- Paraskevaïdis E, Koliopoulos G, Alamanos Y, Malamou-Mitsi V, Lolis ED, Kitchener HC. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2001 Nov;98(5 Pt 1):833-6.
- Park JY, Bae J, Lim MC, Lim SY, Lee DO, Kang S, Park SY, Nam BH, Seo SS. Role of high risk-human papilloma virus test in the follow-up of patients who underwent conization of the cervix for cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol.* 2009 Jun;20(2):86-90. doi: 10.3802/jgo.2009.20.2.86. Epub 2009 Jun 29.
- Pratt MM, Sirajuddin P, Poirier MC, Schiffman M, Glass AG, Scott DR, Rush BB, Olivero OA, Castle PE. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in cervix of women infected with carcinogenic human papillomavirus types: an immunohistochemistry study. *Mutat Res.* 2007 Nov 1;624(1-2):114-23. Epub 2007 May 5.
- Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Sep;96(9):1054-60.
- Ramos MC, Pizarro De Lorenzo BH, Michelin MA, Murta EF. High-grade cervical intraepithelial neoplasia, human papillomavirus and factors connected with recurrence following surgical treatment. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2008;35(4):242-7.

- Ryu A, Nam K, Kwak J, Kim J, Jeon S. Early human papillomavirus testing predicts residual/recurrent disease after LEEP. *J Gynecol Oncol.* 2012 Oct;23(4):217-25. doi: 10.3802/jgo.2012.23.4.217. Epub 2012 Sep 19.
- Sarian LO, Derchain SF, Pitta Dda R, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol.* 2004 Dec;31(4):270-4
- Sarian LO, Derchain SF, Pittal Dda R, Andrade LA, Morais SS, Figueiredo PG. Human papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Tumori.* 2005 Mar-Apr;91(2):188-92.
- Shew ML, Fortenberry JD. HPV infection in adolescents: natural history, complications, and indicators for viral typing. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005 Jul;16(3):168-74.
- Silva IF. Contribuição dos fatores clínicos, epidemiológicos e genéticos na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero em mulheres brasileiras. [Dissertação de Doutorado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública-Fundação Oswaldo Cruz; 2008.
- da Silva IF, Koifman RJ, Mattos IE. Epidemiological characteristics related to treatment failure of preinvasive cervical intraepithelial neoplasia among Brazilian women. *Int J Gynecol Cancer.* 2009 Nov;19(8):1427-31.
- Silva J, Ribeiro J, Sousa H, Cerqueira F, Teixeira AL, Baldaque I, Osório T, Medeiros R. Oncogenic HPV Types Infection in Adolescents and University Women from North Portugal: From Self-Sampling to Cancer Prevention. *J Oncol.* 2011;2011:953469. Epub 2011 Nov 28.
- Song SH, Lee JK, Oh MJ, Hur JY, Na JY, Park YK, Saw HS. Persistent HPV infection after conization in patients with negative margins. *Gynecol Oncol.* 2006 Jun;101(3):418-22. Epub 2006 Jan 4.
- Soutter WP, de Barros Lopes A, Fletcher A, Monaghan JM, Duncan ID, Paraskevaidis E, Kitchener HC. Invasive cervical cancer after conservative therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet.* 1997 Apr 5;349(9057):978-80.
- Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13(2):148-53.

- Strander B, Ryd W, Wallin KL, Wäreby B, Zheng B, Milsom I, Gharizadeh B, Pourmand N, Andersson-Ellström A. Does HPV-status 6-12 months after treatment of high grade dysplasia in the uterine cervix predict long term recurrence? *Eur J Cancer*. 2007 Aug;43(12):1849-55. Epub 2007 Jul 5.
- Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, Podistov J, Chemeris G, Sozaeva L, Lipova E, Tsidaeva I, Ivanchenko O, Pshepurko A, Zakharenko S, Nerovjna R, Kljukina L, Erokhina O, Branovskaja M, Nikitina M, Grunberga V, Grunberg A, Juschenko A, Santopietro R, Cintonino M, Tosi P, Syrjanen S. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*. 2006 Nov-Dec;26(6C):4729-40.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011 Oct;28(10):2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121. Epub 2011 May 4.
- Tate JE, Resnick M, Sheets EE, Crum CP. Absence of papillomavirus DNA in normal tissue adjacent to most cervical intraepithelial neoplasms. *Obstet Gynecol*. 1996 Aug;88(2):257-60
- Wang SS, Hildesheim A. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):35-40.
- Yetimalar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylyu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Mar;285(3):805-10. Epub 2011 Aug 10.

Anexo I



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
Prot. 30/04 - Aprovado em 26/06/06

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A influência do polimorfismo no códon 72 do gene *Tp53* na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero

Instituição: Fundação Osvaldo Cruz/ Escola Nacional de Saúde Pública / INCA
Pesquisadora responsável: Ilce Ferreira da Silva

Identificação da Paciente: _____
(Nome completo da Paciente em letras maiúsculas)

I. Introdução:

Você está sendo convidada a participar de um estudo que vai pesquisar algumas lesões que aparecem antes do câncer de colo de útero. Antes de você concordar em participar desta pesquisa, é importante que você leia e entenda as explicações sobre o estudo e o que vamos fazer. Caso você seja HIV positiva, esteja grávida, ou pretenda engravidar nos próximos dois anos, não estará participando deste estudo neste momento.

O câncer de colo uterino representa um importante problema de saúde pública, sendo responsável pela morte de milhares de mulheres todos os anos no Brasil e no mundo. O acompanhamento e o tratamento adequado das lesões observadas no exame de Papanicolaou é muito importante para evitar o câncer de colo uterino.

Sabemos que alguns fatores como infecção pelo vírus HPV (Papillomavirus Humano), fumo e uso de contraceptivos orais podem influenciar o desenvolvimento do câncer de colo de útero. Além disso, existe uma proteína chamada p53, encontrada no sangue das pessoas, que pode ser importante para a defesa do nosso corpo contra os danos causados pelo vírus HPV (Papillomavirus Humano).

Existem três tipos de lesão muito comuns, chamadas NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) I, NIC II e NIC III que aparecem antes do câncer. Em algumas pessoas essas lesões, quando tratadas desaparecem, porém em algumas mulheres isso não acontece e ainda não se sabe porque. Nossa pesquisa é uma tentativa para descobrir porque as pessoas com estas lesões respondem de maneira diferente ao mesmo tratamento. Esse conhecimento será muito importante, pois poderá nos indicar novas formas de tratamento para aquelas pessoas que não respondem bem ao tratamento usual. Portanto, nesta pesquisa, queremos saber se as diferentes formas da proteína p53, observada no sangue das pessoas, influencia a cura ou não das lesões que surgem antes do câncer, quando tratadas. Para fazer isso vamos convidar algumas pessoas com esses tipos de lesão para participar do estudo. As pessoas que aceitarem o convite terão de responder a um questionário e permitir que os materiais coletados para os exames de rotina (sangue e amostras de tecido) possam ser utilizados na pesquisa das alterações genéticas que podem estar associadas ao câncer cervical.

A sua participação é muito importante, mas gostaríamos de deixar claro que esta pesquisa é independente do seu tratamento e que ele não deixará de ser feito, caso você não concorde em participar. Você poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, bastando informar ao pesquisador responsável.

Versão de maio de 2006

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP - INCA

1



Garantimos que sua participação será confidencial e sua identidade será mantida em sigilo. Os dados do estudo serão divulgados em conjunto (agrupados), sem qualquer risco de identificação das pessoas que participarem do mesmo.

2. Ojetivo:

O objetivo do estudo é saber se as diferentes formas da proteína p53, observadas no sangue nas pessoas, influenciam ou não a cura das lesões que surgem antes do câncer quando tratadas, considerando também a infecção pelo HPV (Papillomavirus Humano) e outros fatores, como fumo e uso de contraceptivos orais.

3. Procedimentos do Estudo:

Caso você concorde em participar deste estudo, você deverá assinar duas vias deste termo de consentimento. Em seguida você fará uma colposcopia (que é o procedimento de rotina do hospital), responderá a um questionário e doará uma amostra de sangue (aproximadamente 10 ml) para os exames de rotina, para a análise das alterações genéticas que podem estar relacionadas ao câncer cervical e **para a dosagem da cotinina (um derivado da nicotina)**. Caso você apresente alguma lesão no colo do útero o médico realizará uma biópsia (retirada do tecido alterado), que será analisado. Parte deste tecido será encaminhado para um laboratório para identificar se há ou não infecção pelo vírus HPV e o tipo de vírus presente e o restante será encaminhado para o laboratório de patologia para avaliar que tipo de lesão você tem.

Se você tiver uma alteração igual ou menos grave do que Neoplasia Intraepitelial Cervical III você será submetida a sete consultas para acompanhamento. Uma consulta a cada três meses no primeiro ano e a cada 4 meses no segundo ano. Nessas consultas serão feitas novas entrevistas para atualizar algumas informações e novas coletas de amostras de células do colo do útero para o exame preventivo (exame de Papanicolaou) e para a detecção do HPV (Papillomavirus Humano). **Além disso, será colhida uma amostra de saliva (aproximadamente 10ml) para dosagem da cotinina, na 4ª consulta de seguimento.**

4. Riscos e Segurança do Paciente:

Você não terá nenhum risco além daqueles já previstos nos procedimentos de rotina para o tratamento das lesões, que você vier a apresentar nos exames (citologia, colposcopia, CAF, biópsia ou conização).

5. Benefícios da participação do estudo:

A importância da sua participação neste estudo é tornar possível que novas descobertas possam, no futuro, ajudar as mulheres portadoras de lesões que aparecem antes do câncer de colo de útero. Essas mulheres serão orientadas, tratadas e acompanhadas de forma especial, aumentando as suas chances de cura e diminuindo as chances da doença voltar.

6. Custos e Reembolso:

A participação no estudo é voluntária e você não será prejudicada caso não aceite participar. Todos os cuidados assim como os tratamentos serão os mesmos feitos para todas as pessoas atendidas no hospital. A coleta de amostra de sangue, citologia (Preventivo) e o



tratamento conservador (colposcopia, cirurgia de alta frequência, biópsia e conização) para obtenção do fragmento do tumor, são realizados como procedimentos de rotina para tratamento, diagnóstico e acompanhamento, independente da realização do estudo.

Entretanto, sabendo que você terá um custo de transporte e alimentação para participar deste estudo, está previsto o reembolso dessas despesas equivalente a dez reais (R\$10,00) para cada consulta de acompanhamento da doença.

7. Contatos para Informação/dúvida:

Em caso de dúvida, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável por este estudo, En^h Ilce Ferreira da Silva através dos telefones: (21)9751.2272 / 2276.4964/4988/4955 ou En^h Simone Soares (2276.4955/4877); e a Dra. Adriana Scheliga, pelo telefone (21) 3233.1410.

Você sempre será comunicada caso apareça alguma informação nova, que possa mudar a sua vontade de participar deste estudo.


Assinaturas do consentimento:

Foram fornecidos a mim os detalhes dos riscos, benefícios e segurança relacionados à minha participação neste estudo. Eu entendo que sou livre para aceitar ou recusar e que posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão e sem prejudicar o meu tratamento.

Concordo que o meu material biológico (sangue, tecido, etc) e as informações coletadas durante os exames, sejam usados nesta pesquisa. Concordo em dar acesso direto de meus registros médicos aos pesquisadores envolvidos neste estudo, como também às autoridades nacionais. Não perderei qualquer direito que me é concedido pelas leis locais ao assinar este documento.

Os resultados da pesquisa realizada poderão ser explicados a mim sempre que disponíveis, em linguagem acessível, quando por mim solicitado e poderão ser divulgados de forma agregada mantendo minha identidade em segredo.

Eu li e entendi a informação apresentada neste documento de consentimento livre e esclarecido. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Portanto, concordo livremente em participar deste estudo.

_____ Nome do sujeito da pesquisa (letra de forma)	____/____/____ Data	_____ Assinatura
_____ Nome da pessoa que obteve o consentimento	____/____/____ Data	_____ Assinatura
_____ Nome da 1ª testemunha(letra de forma)	____/____/____ Data	_____ Assinatura
_____ Nome da 2ª testemunha(letra de forma)	____/____/____ Data	_____ Assinatura
Ilce Ferreira da Silva Pesquisadora Principal	____/____/____ Data	_____ Assinatura 

Versão de maio de 2006

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP - INCA

3

Anexo II

Escola Nacional de Saúde Pública / Fundação Oswaldo Cruz
Departamento de Epidemiologia (DEM QS)
FICHA DE COLETA DE DADOS DE PATOLOGIA CERVICAL

Responsável: Ilce Ferreira da Silva

Código no estudo: |_|_|_|_|_|_|_|_|

Instituição: _____

Data de Entrada no Estudo: //

1 – Identificação:

1.1 – Nome: _____ MH: _____

1.2 – Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

1.3 Endereço _____

1.4 Bairro: _____ 1.5 Cidade: _____

CEP: -

1.6-Ponto de referência: _____

1.7-Tel. Contato: _____

1.8 - Data de Nascimento: // Idade: _____

2 – Dados Sociodemográficos:

2.1 – Estado Civil: Solteira Casada Viúva Tem companheiro 99

2.2 – Cor: Branca Negra Parda Amarela (oriental) 99

2.3 – Profissão: _____

2.4 – Escolaridade: Não estudou 2º grau completo
1º grau Incompleto 3º grau incompleto
1º grau completo 3º grau completo
2º grau incompleto

3 – História Sexual e Reprodutiva:

3.1.1 – DUM: // 3.1.2 Menarca: ___ anos 3.1.4 Menopausa: ___anos

3.1.5 Gesta:___ 3.1.6 Para:___ 3.1.7 Aborto: ___ 3.1.8 Início da vida sexual: |__|__|

anos

3.1.9 N° de parceiros: _____

3.2 – DST

Tratou?

	Sim	Não	Quantas vezes	Sim	Não
Gonorréia			_____		
Sífilis			_____		
Herpes			_____		
Condiloma			_____		
HIV			*	*	*

3.2.2 – Uso de contraceptivo? . Sim . Não |__| Já usou

Qual? Tempo de Uso (em anos)

. Diu _____

. Diafragma _____

. Pílula _____ Qual? _____

. Condon _____

. Outros _____ **Especificar:** _____

4 – Outras patologias:

4.1 – Patologias	Sim	Não	Data diagnóstico	Tempo em meses
Diabetes			/ /	_____
Hipertensão			/ /	_____
Obesidade			/ /	_____
Lupus			/ /	_____

5 – Hábitos:

5.1 – Fumo: Sim Não Ex-fumante

Idade de Início	Idade que parou	Tipo de cigarro (a)	Marca	N°/dia
__ __	__ __	__	_____	__ __
__ __	__ __	__	_____	__ __
__ __	__ __	__	_____	__ __

(a) 1- Manufaturado, com filtro 4- Enroladinho de palha

2- Manufaturado, sem filtro (b) Cachimbo.

3- Enroladinho de papel (c) Charuto

(d) Maconha

5.2 – Mora (ou já morou) com alguém que fuma: sim não

Sua idade quando ele(a) iniciou	Sua idade quando ele(a) parou	Nº horas que ele fuma(va) em sua presença
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> na semana <input type="text"/> final de semana
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> na semana <input type="text"/> final de semana
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> na semana <input type="text"/> final de semana

5.3 – Trabalha (ou trabalhou) em lugar fechado onde as pessoas fumam:

sim não

Sua idade de início	Sua idade de término	Nº horas/dia que estava exposta	Nível de Fumaça (1) Muita (2) Pouca / (9) não lembra
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

6 – História Ginecológica:

6.1 – Último Preventivo: / / Resultado: _____

6.2 – Cauterizações anteriore: . Sim . Não quantas? _____ Há quanto tempo? _____

6.3 – tratamentos anteriore: . Sim . Não quais? _____ Há quanto tempo? _____

7 - Encaminhada como . NIC I . NIC II . NIC III . ASCUS/AGUS

7.1 – Conduatas:

Apenas colposcopia ()

Colposcopia e biópsia ()

Biópsia de ectocérvice () Biópsia de endocérvice() EAZT ()

Fatia anterior e posterior () Fatia anterior () Fatia Posterior () Canal ()

7.1.A - .. Citologia 7.1.A 1 – Data citologia entrata: / /

7.1.A 2 - Amostra: Satisfatória

Insatisfatória

Satisfatória, mas limitada por _____

7.1.B - .. Colposcopia Data: / /

7.1.B1 – Resultado:

- Satisfatória sem lesão
- Insatisfatória sem lesão
- Insatisfatória com lesão
- Satisfatória com lesão
- Colo não localizado

7.1.B2: ZONA DE TRANSFORMAÇÃO:

7.1.B2A: Grau 0: ou área iodo clara muda ()

7.1.B2B: Grau 1: epitélio branco fino () mosaico regular () pontilhado regular()

7.1.B2D: Grau 2: . . Sim . . Não

7.1.B2D1: orifícios glandulares espessados: . Sim . Não

7.1.B2D2: epitélio branco espessado: . Sim . Não

7.1.B2D3: mosaico irregular: . Sim . Não

7.1.B2D4: vasos atípicos: . Sim . Não

7.1.B2D5: pontilhado irregular: . Sim . Não

7.1.B2E: Neoplasia Invasiva: . . Sim . . Não

7.1.C – Biópsia . . Sim . . Não Data: / /

7.1.C1 – Procedimento: Retirada total da lesão

Retirada parcial da lesão

Outro: _____

7.1.C2 – Histopatologia:

7.1.C3 – Conclusão: Negativo para neoplasia

Compatível com HPV

NIC II (Displasia moderada)

NIC III

CA *in situ*

CA invasivo

Adenocarcinoma *In situ*

Adenocarcinoma invasor

Outros _____

7.1.C4 – Margens Cirúrgicas:

Livres

Comprometidas

Sem possibilidade de avaliação

Outro _____

7.1.C5 – Recomendação:

- Citologia
- Colposcopia
- CAF
- Outro _____

7.1.C6 – **Agendamento:** dias Data: //

7.1.D – CAF . . . Sim . . . Não Data: //

- 7.1.D1 – **Procedimento:** Retirada total da lesão
 Retirada parcial da lesão
 Outro: _____

7.1.D2 – **Histopatologia:**

- 7.1.D3 – **Conclusão:** Negativo para neoplasias
 Compatível com HPV
 NIC II (Displasia moderada)
 NIC III
 CA *in situ*
 CA invasivo
 Adenocarcinoma *In situ*
 Adenocarcinoma invasor
 Outros _____

7.1.D4 – **Margens Cirúrgicas:**

- Livres
- Comprometidas
- Sem possibilidade de avaliação
- Outro _____

7.1.D5 – **Recomendação:**

- Citologia
- Colposcopia
- Outro _____

7.1.D6 – **Agendamento:** dias Data: / /

Entrevistador: _____

Anexo III



Ilice Ferreira da Silva
Pesquisadora Principal

COORDENAÇÃO DE PESQUISA
Serviço de Pesquisa Clínica-SPC-CPQ
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2004

Ref. Prot. nº 30/04 – A influência do polimorfismo no códon 72 do gene Tp53 na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero

Prezada Doutora,

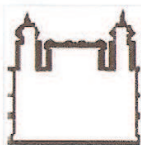
Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após reanálise decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: A influência do polimorfismo no códon 72 do gene Tp53 na evolução das lesões precursoras do câncer de colo de útero, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em 10 de agosto de 2004.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dr. Luis Otávio Olivatto
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo IV



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SÉRGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da influência da infecção por HPV e dos fatores epidemiológicos no insucesso do tratamento de mulheres com lesões precursoras do câncer cervical.

Pesquisador: Vanessa Wallerstein Mignone dantas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03551612.0.0000.5240

Instituição Proponente: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - ENSP/FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 137.079

Data da Relatoria: 05/11/2012

Apresentação do Projeto:

Descrito em parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Descrito em parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descrito em parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Descrito em parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Descrito em parecer anterior.

Recomendações:

Descrito em parecer anterior.


Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:


Prof. Angela Esher
Coordenadora
Comitê Ética em Pesquisa
05/11/2012

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.041-210

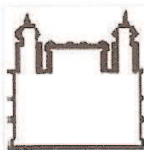
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2598-2863

Fax: (21)2598-2863

E-mail: cep@ensp.fiocruz.br



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SÉRGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 01 de Novembro de 2012

Assinador por:
Ângela Fernandes Esher Moritz
(Coordenador)

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.041-210

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2598-2863

Fax: (21)2598-2863

E-mail: cep@ensp.fiocruz.br