

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

MARIO CEZAR SAFFI JUNIOR

**POTENCIAL DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AOS MARCADORES
BIOMOLECULARES RNAm IDO E RNAm *CDKN2A/p16* NA PREDIÇÃO DAS
LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO**

São Paulo

2015

MARIO CEZAR SAFFI JUNIOR

**POTENCIAL DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AOS MARCADORES
BIOMOLECULARES RNAm IDO E RNAm *CDKN2A/p16* NA PREDIÇÃO DAS
LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE COLO UTERINO**

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em
Medicina da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Medicina.

Prof. Cléber Pinto Camacho, Dr. – Orientador, UNINOVE

Prof. Humberto Delle, Dr. – Orientador, UNINOVE

Prof. Sérgio Makabe, Dr. – Orientador, UNINOVE

São Paulo

2015
FICHA CATALOGRÁFICA

Saffi Junior, Mario Cezar.

Potencial dos fatores de risco associados aos marcadores biomoleculares RNAm *IDO* e RNAm *CDKN2A/P16* na predição das lesões precursoras do câncer de colo uterino. /Mario Cezar Saffi Junior. 2015.

68 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr. Cleber Pinto Camacho.

1. Neoplasias do colo do útero. 2. Lesões pré-neoplásicas; HPV. 3. Citologia. 4. Fatores de risco. 5. Colposcopia.

I. Camacho, Cleber Pinto.

II. Título

CDU 616

São Paulo, 22 de janeiro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

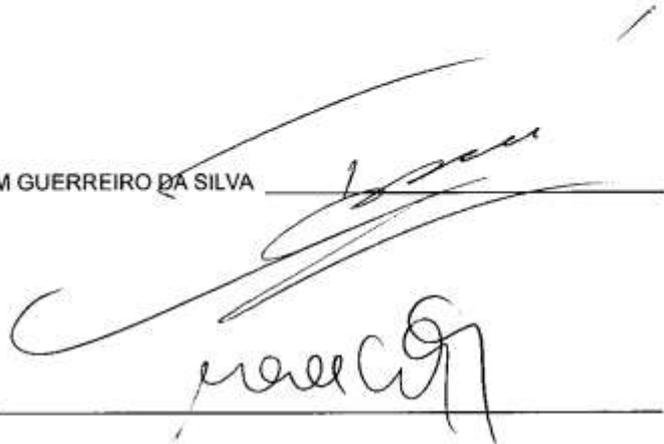
Aluno (a): MARIO CEZAR SAFFI JÚNIOR

Título da Dissertação: "Potencial dos fatores de risco associados aos marcadores biomoleculares, RNAⁿ IDO e RNA^m IDO CDKN2A/p16 na predição das lesões precursoras do câncer de colo uterino"

Presidente: PROF. DR. CLÉBER PINTO CAMACHO



Membro: PROF. DR. ISMAEL DALE COTRIM GUERREIRO DA SILVA



Membro: PROF. DR. RUBENS CHOJNIAK



Membro: PROFA. DRA. IVONE DA SILVA DUARTE



Dedico este trabalho

À Deus por me dar saúde e forças neste árduo trabalho

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao meu amigo Sérgio Makabe pela sua ajuda inestimável.

À Pós-graduação em Medicina e à UNINOVE pela oportunidade oferecida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho e aos meus Coorientadores Prof.

Dr. Humberto Dellê e Prof. Dr. Sérgio Makabe, pelas horas de ensinamento, pelas palavras de incentivo e, principalmente, por me acolherem e acreditar em mim num momento de abandono.

À Profa. Dra. Ivone Da Silva Duarte pelo incentivo e por suas orientações essenciais.

À minha amiga Maria Letícia Carniel Brigladori por estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando durante esta jornada.

Aos colegas Rodrigo Barbosa e Giovana Prado pelo companheirismo e ajuda durante o trabalho.

Ao Setor de Patologia do Trato Genital Inferior e à diretoria geral do Conjunto Hospitalar do Mandaqui por tornarem possível a realização da casuística deste estudo.

À diretora da Pós – graduação *Strictu Sensu*, Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo pela oportunidade de ingressar neste programa de pós – graduação.

À diretoria do curso de Medicina da Universidade Nove de Julho por incentivar os docentes a se pós – graduarem.

À todas as pacientes que aceitaram participar deste trabalho

“Nunca se explique. Seus amigos não precisam e seus inimigos jamais acreditarão...”

Autor desconhecido.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: Mario Cezar Saffi Junior

Título da dissertação: “Potencial dos fatores de risco associados aos marcadores biomoleculares RNAm IDO e RNAm *CDKN2A/p16* na predição das lesões precursoras do câncer de colo uterino”.

Presidente: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho (orientador)

Membro: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva (convidado)

Membro: Prof. Dr. Cecília Maria Roteli Martins (suplente)

Membro: Prof. Dr. Rubens Chojniak

Membro: Profa. Dra. Ivone da Silva Duarte (suplente)

São Paulo

2015

Resumo

O câncer de colo uterino apresenta-se como a principal neoplasia do trato genital feminino no Brasil, sendo o HPV fator essencial para a carcinogênese. O programa brasileiro de rastreamento propõe a citologia oncológica cervical convencional como principal método para detectar o câncer do colo uterino, apesar da sua baixa sensibilidade. Os fatores de risco associados ao contágio do HPV são desprezados e não contamos com uma ferramenta biomolecular que possa incrementar o programa oferecido pelo Ministério da Saúde. O objetivo desse trabalho foi verificar se os fatores de risco para o câncer de colo uterino podem contribuir com a citologia oncológica cervical convencional para aumentar a sensibilidade diagnóstica e avaliar se o *RNA^m Indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO)* e o *RNA^m CDKN2A/p16* podem incrementar a capacidade diagnóstica dessa neoplasia. A análise de regressão logística foi baseada nas variáveis clínicas (fatores de risco), citológicas e biomoleculares a fim de buscar uma associação com o resultado anatomopatológico. A proporção de variação explicada (PVE) por cada uma das variáveis estudada foi calculada pela fórmula ômega, enquanto que a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo foram calculados pelas fórmulas de Galen e Gambino. Concluímos que o uso do contraceptivo oral mostrou um maior poder de predição de lesões de alto grau em relação aos demais fatores de risco, e que tanto a *RNA^m IDO* quanto o *RNA^m CDKN2A/p16* poderão auxiliar no rastreamento do câncer de colo uterino, seja quando usados de forma isolada, seja

conjuntamente com a citologia cervical convencional, elevando sua sensibilidade e mantendo uma considerável especificidade.

PALAVRAS-CHAVE: Neoplasias do Colo do Útero ; Lesões Pré-Neoplásicas; HPV; Citologia; Fatores de risco; colposcopia; Neoplasia Intraepitelial Cervical; fator prognóstico; genes p16; Indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO

ABSTRACT

The cervical cancer is the first cancer of the female genital tract in Brazil and HPV is essential factor for carcinogenesis. The Brazilian program tracking proposes conventional cervical cytology as the primary method to detect cervical cancer, despite its low sensitivity. Risk factors associated with the spread of HPV are despised and not rely on a biomolecular tool that can increase the program offered by the Ministry of Health. The aim of this study was to determine whether the risk factors for cervical cancer may contribute to the conventional cervical cytology to increase diagnostic sensitivity and assess whether the *mRNA indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)* and *mRNA CDKN2A / p16* may increase the diagnostic yield of this neoplasm. The logistic regression analysis was based on clinical variables (risk factors), cytological and biomolecular to seek an association with pathological results. The proportion of explained variance (PVE) for each variable studied was calculated by the formula omega, whereas the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated by the formulas of Galen and Gambino. We conclude that oral contraceptive showed greater predictive power of high-grade lesions compared to other risk factors, and that both the *IDO mRNA* as *CDKN2A mRNA / p16* may help screening of cervical cancer, either when used alone, or in conjunction with conventional cervical cytology, increasing their sensitivity and maintaining a considerable specificity.

KEYWORDS: Cervical Cancer; Pre-Neoplastic lesions; HPV; cytology; Risk factors; colposcopy; Cervical intraepithelial neoplasia; prognostic factor; p16 genes; *CDKN2A*, Indoleamine 2,3-dioxygenase; IDO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-MT: 1-metilriptofano

ACOG: Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia

AGC: Atipias em Células Glandulares

ASC-H: Atipia de Significado Indeterminado em Células Escamosas não podendo excluir lesão de alto grau

ASC-US: Atipia de Células Escamosas de Significado Indeterminado, possivelmente não neoplásicas.

ASC: Atipia de Células Escamosas

CBL: Citologia de Base Líquida

CCO: Citologia Oncológica Cervical Convencional

CDKs: Quinases Dependentes de Ciclina

COC: Contraceptivo Oral Combinado

DST: Doença Sexualmente Transmissível

E2F: Proteína de Regulação Gênica

HPV: Papiloma Vírus Humano

IC: Intervalo de Confiança

IDO: Indoleamine 2,3 dioxigenase

Ig: Imunoglobulinas

INCA: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

INF γ : Interferon- γ

JEC: Junção Escamo Colunar

LIEAG: Lesão Intra-epitelial de Alto grau

LIEBG: Lesão Intra-epitelial de Baixo grau

LPS: Lipopolissacarídeos

NIC: Neoplasia Intra-epitelial Cervical

NK: Natural Killer

NLGP: Neem leaf glycoprotein

PGE2: Prostaglandina E2

pRB: proteína Retinoblastoma

pRB: Proteína Retinoblastoma

shRNA: small hairpin RNA

TNF α : Fator de Necrose Tumoral α

VPN: Valor Preditivo Negativo

Índice

1. Introdução	16
1.1 Câncer de Colo Uterino	16
1.2 Fatores de Risco	17
1.3 Estratégias de Rastreamento	20
1.4 Citologia Oncológica Cervical Convencional.....	21
1.5 Colposcopia.....	24
1.6 Indoleamine 2,3-dioxygenase.....	25
1.7 RNAm CDKN2A/p16	29
2. Objetivos	32
3. Pacientes e Métodos	33
3.1 População.....	34
3.2 Fatores de Risco	35
3.3 Colposcopia.....	37
3.4 Marcadores Biomoleculares - Expressão de RNAm p16 ^{INK4a} e IDO	39
4. Análise Estatística	41
5. Resultados	42
5.1 Resultados dos Objetivo 1	42
5.2 Resultados do Objetivo 2	48
6. Discussão	50
7. Conclusão:	56
8. Bibliografia	57
9. Anexo I	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Critérios de Inclusão e exclusão	35
Tabela 2: Agrupamento das alterações citológicas de acordo com sua associação com lesão tecidual de alto e baixo grau.....	35
Tabela 3: Lista dos fatores de risco para câncer de colo uterino de acordo com a probabilidade de desenvolver a neoplasia.....	36
Tabela 4: Agrupamento das lesões histológicas de acordo com a probabilidade de evolução para o carcinoma de colo uterino.	39
Tabela 5: Primers utilizados para RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional (detecção do HPV).	41
Tabela 6: Análise descritiva dos dados relacionados ao aumento do risco de câncer de colo uterino e suas lesões precursoras baseado na frequência de cada grupo.	44
Tabela 7: Prevalência dos fatores de risco de acordo com o resultado histológico.....	45
Tabela 8: Relação entre as imagens colposcópicas e o resultado da análise anatomopatológica das biopsias.	46
Tabela 9: Relação entre os achados histológicos e suas alterações citológicas.....	46
Tabela 10: Associação dos fatores de risco e alterações histológicas	47
Tabela 11: Poder de predição das lesões histológicas de alto grau de cada fator de risco isolado e associados entre si	48
Tabela 12: Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN dos biomarcadores moleculares e da COC de forma isolada e associada, partindo-se de um Pré - teste de 48%	49
Tabela 13: Poder de predição das lesões histológicas de alto grau da COC e de cada biomarcador molecular isolado e associados entre si.....	50

1. Introdução

1.1 Câncer de Colo Uterino

O câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, com 527 mil novos casos registrados em 2013 (INCA, 2014). Esse câncer foi responsável pelo óbito de 265 mil mulheres em 2012; sendo que 87% deles ocorreram em países em desenvolvimento (OMS, 2013). No Brasil, o câncer de colo uterino é a principal neoplasia maligna do trato genital feminino e a terceira mais frequente nas mulheres, precedido pelo câncer de mama, cólon e reto (INCA, 2014).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), em 2014, serão esperados cerca de 15.590 casos novos de câncer do colo do útero no Brasil, com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar das altas taxas de incidência, o câncer de colo uterino pode ser considerado uma doença evitável, uma vez que a evolução de uma lesão precursora ao carcinoma propriamente dito é longa; assim, com o diagnóstico e o tratamento precoce das lesões pré-neoplásicas as taxas de cura são altas (Berek, 2012).

A relação do Papiloma Vírus Humano (HPV) com câncer de colo uterino e suas lesões precursoras está bem estabelecida e demonstrada por pesquisas realizadas nas últimas décadas. Sabe-se que essa neoplasia pode estar associada à infecção por vários tipos de HPV, em quase todos os casos (Abrão, 1995).

A partir da década de 70, com a descoberta da associação dos diversos subtipos de HPV com as lesões pré-invasivas e invasivas do colo uterino, a etiologia viral da neoplasia pareceu confirmar-se e, diante disso, determinados subtipos de HPV, como 16, 18, 31,

33, 35 e 39, seriam os agentes necessários, apesar de não suficientes, para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino (Haghshenas M, 2013; Richart, 1993).

Esses vírus teriam uma alta transmissão sexual e seriam responsáveis pela alta incidência das lesões pré-invasivas do colo uterino (Kjaer SK, 2001; Richart, 1993).

Estudos demonstraram a presença de partículas do vírus em mais de dois terços dos casos de câncer do colo uterino, em suas fases invasoras e intra-epiteliais (Richart, 1993;

Winer, R.L, 2003). Dos vários sorotipos virais, os de número 16 e 18 são os mais frequentemente detectados nas células com atipias importantes. Pelos conhecimentos atuais, admite-se que o HPV atue no DNA celular de várias maneiras: integrando-se ao genoma das células hospedeiras, ativando alguns genes supressores tumorais, promovendo instabilidade genômica, aumentando a atividade da telomerase, promovendo evasão imune e outros eventos moleculares que são capazes de induzir modificações na morfologia e no comportamento da célula normal (Sapp, 2009).

A carcinogênese cervical é um processo progressivo que leva à transformação dos tecidos cervicais normais, a partir da evolução das neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) grau 1 ao grau 3, ao câncer (Iarc, 2007). Atualmente, os mecanismos pelos quais os oncogenes do HPV induzem o processo de carcinogênese cervical ainda não estão totalmente esclarecidos (Edmonds, 2007).

1.2 Fatores de Risco

Os fatores de risco mais associados ao contágio do HPV e, conseqüentemente, ao câncer de colo uterino e suas lesões precursoras são: idade, etnia, sexarca precoce, multiplicidade de parceiros sexuais, doença sexualmente transmissível (DST), uso de contraceptivo oral combinado (COC), não uso de preservativo masculino durante o coito, multiparidade e o tabagismo (Demers, 2012; Hoffman, 2014).

A idade média de diagnóstico do câncer de colo uterino é de 48 anos (*National Cancer Institute*, 2011), sendo a segunda causa de morte por neoplasias, nas mulheres entre os 20 e 39 anos (Jemal, 2010). A idade avançada aumenta a probabilidade de infecção persistente pelo HPV e permite o acúmulo de mutações que podem levar à transformação celular maligna. Além disso, a menor necessidade de cuidados pré-natais e de uso de COCs dificulta a adesão das mulheres maduras aos programas de prevenção do câncer de colo uterino (Hoffman, 2014).

No Brasil, em relação à etnia, este câncer é mais incidente nas mulheres não brancas, ou seja, pardas e negras, com predomínio muito significativo em mulheres afrodescendentes (Thuler, 2012).

A sexarca precoce, a relação sexual sem uso de preservativos e a multiplicidade de parceiros favorecem o contágio dos subtipos oncogênicos do HPV, os quais são responsáveis pelo aumento da incidência das Lesões Teciduais de Alto Grau (Lonky, 2002; Nunes, 2014). Por outro lado, a quantidade exata de parceiros sexuais necessários para aumentar o risco de câncer de colo uterino, ainda não é consenso.

A paridade também está relacionada ao carcinoma cervical, porém, o mecanismo responsável ainda é incerto, visto que algumas hipóteses se referem ao tempo de exposição do epitélio cervical aos hormônios gestacionais, à baixa imunidade durante a gestação e aos traumas cervicais durante o parto. Entretanto, o número de partos a partir dos quais há aumento do risco de câncer de colo uterino ainda não é consenso, na literatura (Brinton, 1989; Muñoz, 2002). Um estudo mexicano estimou que mulheres que pariram sete vezes com gestações a termo tem um risco quatro vezes maior de desenvolver essa neoplasia, ao passo que aquelas com um ou dois partos prévios tem seu risco aumentado em duas vezes em comparação às nulíparas (Muñoz, 2002).

Segundo um estudo brasileiro, mulheres que pariram quatro vezes ou mais cursaram com aumento da incidência de câncer de colo uterino; porém, em trabalhos internacionais, essa paridade parece ser maior ou igual a doze para que esse risco seja relevante (Murta, 1999).

A relação entre o tabagismo e o carcinoma escamoso do colo uterino está bem estabelecida, enquanto que sua associação com adenocarcinoma ainda é incerto (*International Agency for Research on Cancer*, 2004; Trimble, 2005). O consumo frequente de mais de um maço/ano durante o menacme aumenta o risco dessa neoplasia devido às alterações na composição fisiológica do muco cervical que passa a ser composto por agentes mutagênicos e carcinogênicos (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2004; Koshiol, 2006). Alterações na resposta imunológica local, diminuição da atividade das células *Natural Killer* (NK) e das imunoglobulinas (Ig) G e A e diminuição da depuração do HPV de alto risco também são efeitos inerentes ao tabagismo. Esta relação se fortalece quando se demonstra que a cessação do tabagismo reduz esse risco (Guillaud, 2014; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2004; Hoffman, 2014).

Os COCs aumentam o risco do câncer de colo uterino quando utilizado de forma prolongada, pois promovem maior exposição do frágil epitélio glandular presente na junção escamo colunar (JEC) à ação do HPV durante o coito (INCA, 2014). Os esteróides encontrados nos COCs afetam o genoma do HPV aumentando a expressão viral das oncoproteínas E6 e E7, além de atuarem como agentes anti-apoptóticos que possibilitam a proliferação das células infectadas (Amaral, 2014; De Villiers, 2003). Diante disso, observou-se que há aumento do risco de câncer de colo uterino em duas vezes quando os COCs são utilizados por mais de 5 anos e um declínio com sua interrupção

(*International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*, 2007; Moreno, 2002). Trabalhos realizados com mulheres na pós-menopausa que faziam uso de terapia de reposição hormonal oral com estrogênio e progesterona, não mostraram aumento do risco para essa neoplasia, independente do tempo de uso (Yasmeen, 2006).

1.3 Estratégias de Rastreamento

Existem vários programas de rastreamento do câncer do colo do útero e todos têm como objetivo identificar as mulheres com risco aumentado de desenvolver lesões pré-neoplásicas e o câncer cérvico-uterino propriamente dito (Nanda, 2000; Berek, 2012).

O Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia (ACOG) recomenda que o rastreamento do câncer de colo uterino, nas mulheres de baixo e médio risco para o carcinoma se inicie, independentemente da história sexual, aos 21 anos de idade e deve ser realizado a cada dois anos até os 29 anos, podendo-se utilizar tanto com a Citologia Oncológica Cervical Convencional (CCO) ou Citologia de Base Líquida (CBL) (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2009). Após os 30 anos de idade o intervalo passa a ser trienal desde que os três últimos exames tenham sido negativos (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2009). Esse processo pode ser interrompido aos 65 ou 70 anos após 3 exames consecutivos negativos ao longo dos últimos 10 anos. Mulheres mais idosas com vida sexual e multiplicidade de parceiros devem continuar o rastreamento após a menopausa, pois não está claro se o colo uterino se mantém em risco para neoplasia quando exposto a uma nova infecção pelo HPV (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2009; Saslow, 2002).

Outra forma de rastreio envolve a detecção isolada do HPV de alto risco através da captura híbrida (Cuzick, 2006). Quando este método é utilizado de forma isolada há

aumento da sensibilidade em mais de duas vezes (>90%) com perda significativa da especificidade se comparado com a citologia realizada de forma isolada. Por isso, deve ser usado com cautela nas mulheres jovens devido à alta prevalência dos HPVs de alto risco que geralmente não resulta em lesão tecidual (Mayrand, 2007; Ronco, 2006, 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o uso da CCO no rastreamento do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras nas mulheres de 25 anos de idade com vida sexual ativa. Esse exame pode ser realizado a cada três anos desde que pelo menos duas citologias estiverem negativas nos últimos dois anos. A interrupção dá-se aos 64 anos de idade após dois exames negativos consecutivos, nos últimos cinco anos (Ministério da Saúde, 2011).

1.4 Citologia Oncológica Cervical Convencional

A CCO tem uma alta especificidade, em torno de 98%, enquanto que sua sensibilidade é mais baixa e variável. Um estudo realizado pela *Agency for Health Care Policy and Research*, em 2006, encontrou uma sensibilidade de 51% (intervalo de confiança de 95%: 37 - 66%) para a detecção de qualquer grau de Neoplasia Intra-epitelial Cervical por uma única citologia convencional, porém com sensibilidade maior para lesões de alto grau (*Agency for Health Care Policy and Research*, 2006). Os exames falso-negativos podem estar relacionados à erros de coleta das amostras e/ou à interpretação citológica. Dessa forma, esse exame deve ser realizado de forma periódica, a fim de tentar corrigir a baixa sensibilidade do método (Wilkinson, 1990).

A interpretação da CCO deve ser bem criteriosa, uma vez que as alterações celulares podem ser decorrentes de quadros inflamatórios, reacionais e até mesmo de infecções

transitórias causadas pelo HPV, as quais geralmente não resultarão em lesão histológica (FEBRASGO, 2010).

Aproximadamente 5% dos esfregaços citológicos são considerados indicativos de lesões causadas pelo HPV ou sugestivos de lesões pré-neoplásicas. Entre estes, cerca de 0,1% indicam a presença de carcinomas invasores, 0,4 a 0,5% sugerem lesões de alto grau e 1 a 2%, lesões de baixo grau. Em 2 a 4% dos esfregaços, o laudo aponta presença de células escamosas atípicas. Entretanto, em alguns casos a porcentagem com este diagnóstico pode chegar a 10% (IARC, 2005; Ministério da Saúde, 2006 e Sebastião, 2004).

Segundo dados registrados no Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO), em 2009, a alteração citológica mais frequente, no rastreamento populacional para o câncer cervical através da CCO, foi a atipia de células escamosas (ASC) que representou 1,4% de todos os exames realizados e 53,5% de todos os exames alterados (BRASIL/MS/SISCOLO, 2010). A atipia de células escamosas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASC-US) representou de 1,2% dentre todos os exames realizados e de 46% considerando-se apenas os resultados alterados; enquanto a atipia de significado indeterminado em células escamosas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H) foi responsável por apenas 0,2% dentre todos os exames realizados e de 7% dos resultados alterados (BRASIL/MS/SISCOLO, 2010). A lesão intra-epitelial de baixo grau (LIEBG) é o segundo mais frequente, correspondendo 31% dos exames anormais; enquanto que a prevalência de lesão intra-epitelial de alto grau (LIEAG) foi de 0,25% de todos os exames realizados e 9,7% de todos os exames alterados (BRASIL/MS/SISCOLO, 2010). O achado correspondente às atipias em células

glandulares (AGC) foi de 0,13% entre todos os exames satisfatórios realizados e de 4,6% considerando-se apenas os resultados alterados (BRASIL/MS/SISCOLO, 2010).

Caso as pacientes com qualquer uma das alterações citológicas citadas acima forem submetidas a biópsias guiadas por colposcópico, os resultados histopatológicos poderão ser diversos, porém, na maioria das vezes, concordantes com a CCO (FEBRASGO, 2010).

O risco de câncer em pacientes com ASC é baixo, em torno de 0,1 a 0,2%. Entretanto, 5 a 17% das pacientes com ASC-US e 24 a 94% dos pacientes com ASC-H podem ter um resultado de NIC 2 ou NIC 3 em biópsia (Iarc, 2005 e Sebastião, 2004).

A prevalência de lesões pré-invasivas (NIC 2 / NIC 3) ou câncer, relatada na literatura, após exame citopatológico compatível com LIEBG, varia de 11,8% a 23,3%, mostrando a possibilidade sub - diagnóstica do exame citopatológico (Cuzick, 2008).

Cerca de 50 a 70% das pacientes com LIEAB apresentam achado histológico de NIC 2 / NIC 3; e 1% a 2% terão diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor (Massad, 2001).

Considerando o conjunto de AGC, temos uma associação com NIC 2, 3 ou câncer em 15% a 56% dos casos, sendo as NIC mais comuns e associadas às pacientes com menos de 40 anos e as neoplasias invasivas mais associadas às pacientes acima dessa idade (Dunton, 2008). Entre as atipias em células glandulares sem especificação, o equivalente às AGC possivelmente não neoplásicas, foi encontrada associação com doença (NIC II ou mais grave) em 29% dos casos. Nas AGC que não se pode excluir lesão de alto grau, esse percentual chegou a 57% (Wang, 2009; Zhao2009).

Sabe-se que o agente etiológico do câncer de colo uterino é o HPV, pois está presente em mais de 95% dessas neoplasias (Arbyn, 2008). Estima-se que cerca de 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas pelo vírus em algum momento das suas

vidas; porém, nem todas evoluirão para lesão tecidual propriamente dita pois seu sistema imune encarregar-se-á de eliminá-lo num período entre seis meses a dois anos após o contágio (Iarc, 2007). Presume-se que 32% dessas infecções são causadas pelos subtipos 16, 18 ou ambos (de Sanjosé S, 2007).

Além de aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV (subtipo, infecção única ou múltipla), outros fatores relacionados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual parecem influenciar os mecanismos, ainda incertos, que determinam a regressão ou a persistência da infecção viral, assim como a progressão das lesões precursoras para o câncer (IARC, 2007).

Concluimos que o programa de rastreamento instituído pelo Ministério da Saúde é dependente da citologia convencional, necessitando de uma periodicidade e completa adesão das pacientes para que baixa sensibilidade do método seja compensada (Hoffman, 2014).

1.5 Colposcopia

Trata-se de um procedimento cuja finalidade é examinar o trato genital com um microscópio binocular a fim de identificar lesões pré - neoplásicas ou neoplásicas do colo uterino através de biópsia direta (Mello, 2005). Apesar de possuir uma sensibilidade para detecção de neoplasia de alto grau do colo uterino em torno de 70%, ser um procedimento invasivo e examinador dependente, permanece como padrão-ouro para investigação de pacientes com CCO anormal (Cantor, 2008).

Durante o exame, o colposcopista baseia-se no reconhecimento de alterações das características habituais do epitélio cervical normal após aplicação local de ácido acético e iodo (Mello, 2005; Walker, 2003). No epitélio cervical normal e no epitélio metaplásico

maduro o ácido acético provoca diversas alterações no aspecto habitual desse tecido, como por exemplo: nas lesões de baixo grau, a reação com o ácido acético é menos acentuada, aparecem mais lentamente, os contornos são pouco definidos e irregulares; ao passo que nas lesões de alto grau essas modificações aparecem mais rapidamente após aplicação do ácido acético, apresentam coloração branca mais intensa, margens bem delimitadas, regulares, densa e intensamente opaca na zona de transformação (Sellors, 2010; Mello, 2005; Apgar, 2002; Focchi, 2008).

O epitélio escamoso cervical normal e o epitélio metaplásico maduro contêm células ricas em glicogênio que adquirem uma coloração castanha ou preta após captação de iodo. As lesões de baixo grau apresentam uma positividade parcial com aspecto malhado pela moderada diferenciação do epitélio, enquanto que as lesões de alto grau não são coradas pelo iodo (Mello, 2005; Apgar, 2002; Focchi, 2008).

Os vasos atípicos se associam de forma importante com alterações mais graves do epitélio e se caracterizam por irregularidades de tamanho, calibre, forma, curso e disposição no epitélio (Mello, 2005; Focchi, 2008).

Na medida em que as tecnologias de rastreamento do câncer do colo uterino se tornam mais sensíveis, as pacientes são encaminhadas à colposcopia com lesões menores e mais precoces, algumas aquém dos limites da visualização colposcópica, dificultando ainda mais a realização do exame e contribuindo com a diminuição da sensibilidade do método (DeSantis, 2007).

1.6 Indoleamine 2,3-dioxygenase

A indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO) é uma enzima intracelular que participa do catabolismo do triptofano. A partir da descrição de seu papel em proteger o embrião

contra o sistema imune materno, a IDO ganhou destaque como molécula imunomoduladora. Devido ao fato da IDO ser induzida em situações especiais como por exemplo no câncer, ela tem sido considerada chave em situações de tolerância, inclusive rompendo a vigilância imunológica às neoplasias, sendo, portanto, responsável pela manutenção e desenvolvimento de vários tipos de tumores (Kobayashi, 2008).

Os efeitos da IDO estão relacionados com o catabolismo do aminoácido triptofano, o qual é clivado por meio da inserção de moléculas de oxigênio (Ball, 2009; Lindström, 2012). A

falta de triptofano promove a supressão da proliferação de células específicas, principalmente das células T efetoras que pausam na fase G1 do ciclo celular (Ball, 2009).

A redução da concentração do triptofano, causada pela IDO, reduz o número de células Natural Killer (NK), limitando sua capacidade citotóxica através da diminuição da

expressão de receptores celulares NK e impede a proliferação das células T imunologicamente ativas, fazendo com que entrem em apoptose (Takikawa, 2005; Kudo, 2004). Nesse ambiente, as células tumorais podem driblar o sistema imune devido à ação imunomoduladora da IDO (Kobayashi, 2008; Godin-Ethier, 2011).

A IDO está presente em apenas alguns tipos celulares, como por exemplo as células trofoblásticas, fibroblastos, células epiteliais, células tumorais, macrófagos, células dendríticas e células da micróglia (Inaba, 2010). A via bioquímica ou funcional dessa enzima não é ativada em todas as células, principalmente em condições de homeostase, exceto quando são estimuladas a desencadear sua expressão em resposta às lesões, inflamações e infecções teciduais (Huang, 2010; Huang, 2012).

Nakamura e colaboradores demonstraram que a IDO está ausente no tecido cervical normal e presente no câncer de colo uterino, assim como em suas lesões pré neoplásicas

(Nakamura, 2007). Além disso, alguns poucos estudos sugerem que a inibição dessa enzima pode promover a interrupção da progressão da neoplasia (Sato, 2012). Através de análises imunohistoquímicas, foi possível demonstrar que em pacientes com câncer de colo uterino, endométrio e ovário, há alta expressão da IDO e esta expressão está relacionada à maior progressão tumoral, com conseqüente piora clínica e diminuição da sobrevida das pacientes (Mittal, 2013).

Sabe-se que a expressão da IDO no tecido cervical normal e na neoplasia intra-epitelial cervical 1 é ausente, enquanto que nas neoplasias intra-epiteliais cervicais 2, 3 e áreas de micro invasão a IDO está presente apenas em focos de células displásicas, ao passo que no câncer de colo uterino invasivo está presente em toda área tecidual de invasão e se relaciona com pior prognóstico (Nakamura, 2007; Inaba, 2007; Sucher, 2010).

Sato e colaboradores, utilizando cultura de células neoplásicas do colo uterino (estadiamento clínico I, II, IIIa, IIIb), avaliaram o poder de imunossupressão da IDO sob o câncer de colo uterino e a vantagem da inibição dessa enzima com agentes anti-neoplásicos, seja de forma isolada ou associada à terapia atualmente disponível (Sato, 2012). Após estimularem as células neoplásicas com interferon- γ (INF γ), houve aumento da expressão da IDO, ao passo que a inibição do gene responsável pela produção dessa enzima com a shRNA reduziu drasticamente sua expressão (Sato, 2012). Entretanto, este ensaio não influenciou o crescimento de células neoplásicas, *in vitro*, porém comprometeu o crescimento tumoral *in vivo*, cujo motivo pode ser explicado pelo efeito modulador do sistema imunológico por promover, principalmente, o acúmulo de células NK no estroma do tecido cervical, sugerindo que o silenciamento gênico da IDO pode ter um potencial terapêutico útil nas pacientes diagnosticadas com carcinoma de colo uterino e suas lesões pré - neoplásicas (Sato, 2012).

Baseado nos mecanismos de ação da IDO e na tentativa de entender melhor sua expressão tecidual no carcinoma cervical, Roy e colaboradores realizaram um estudo com cultura de células tumorais cervicais moderadamente diferenciadas de mulheres com câncer de colo uterino estadiamento clínico IIB. Observaram que quando essas células eram estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS) associados à prostaglandina (PGE2) e ao Fator de Necrose Tumoral (TNF α), havia maturação dos linfócitos T CD4+ (Braun, 2005). Essa ativação promoveu maturação acelerada das células dendríticas fazendo com que elas expressem IDO, as quais tiveram seu efeito potencializado na presença do INF γ e do antígeno humano CD40L (Braun, 2005). Por outro lado, a substituição dos LPS pela *Neem leaf glycoprotein* (NLGP) provocou a inibição da maturação das células responsáveis pelo aumento da expressão da IDO (Krause, 2007). Diante disso, os autores concluíram que dependendo da intensidade da inibição das células dendríticas produtoras de IDO, seja pela ação inibitória da NLGP e/ou pelo 1-metilriptofano (1-MT), pode haver uma considerável paralisação da proliferação das células tumorais do colo uterino (estadiamento IIB), assim como em outras doenças malignas (Roy, 2013). Outra pesquisa realizada por Fotopoulou e colaboradores estabeleceu a relação entre os níveis sistêmicos da IDO nas mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino estadiamentos Ib - IIB e que foram submetidas à cirurgia radical convencional (Fotopoulou, 2011) . Observou-se que não houve aumento da concentração sistêmica da IDO, mas uma redução dos seus níveis séricos. Outro dado interessante, foi a menor expressão da IDO no tecido cervical dessas pacientes, contrariando os poucos dados literários disponíveis (Nakamura, 2007; Inaba, 2007).

Inaba e colaboradores comprovaram que a IDO está relacionada com o crescimento tumoral, metástases e ao prognóstico das pacientes com câncer de colo uterino (Inaba,

2010). Notou-se que dentre as 112 pacientes diagnosticadas com câncer de colo uterino (estadiamento Ib-IIb) que foram submetidas à cirurgia radical, apenas 54/112 (48,2%) não expressaram a IDO; 29/112 (25,9%) das amostras apresentaram expressão focal, enquanto que o restante 29/112 (25,9%) expressaram-na de forma difusa. Por outro lado, a IDO não foi expressa em tecido epitelial escamoso nem em células glandulares normais (Inaba, 2010). Adicionalmente, durante os cinco anos de seguimento, a recorrência e a mortalidade foram maiores no grupo de mulheres com aumento da expressão da IDO (Inaba, 2010). Concluiu-se que a expressão da IDO esteve relacionada com a progressão do tumor e piora clínica das pacientes submetidas a cirurgia radical no estadiamento Ib-IIb (Inaba, 2010). Além disso, propuseram que a IDO poderá ser um novo indicador prognóstico pós - operatório e um marcador terapêutico neste tipo de neoplasia (Inaba, 2010).

Esses dados nos mostram que o aumento da expressão da IDO é uma variável independente de prognóstico para a redução da sobrevivência global, piora clínica e aumento de metástase tumoral em pacientes com câncer, indicando que a inibição dessa enzima pode representar uma estratégia eficaz para o tratamento de doenças malignas, quer isoladamente ou em combinação com agentes radioquimioterápicos disponíveis atualmente (Liu, 2009).

Apesar do papel da IDO no prognóstico das pacientes com carcinoma de colo uterino já ter sido avaliado em alguns estudos, sua contribuição no rastreamento do câncer de colo uterino ainda não foi avaliada.

1.7 RNAm CDKN2A/p16

A proteína p16^{INK4A}, expressão do gene CDKN2A, tem a função de inibir as quinases dependentes de ciclina (CDKs), como a CDK4 e a CDK6, as quais promovem a fosforilação e inativação das proteína do retinoblastoma (pRB), paralisando do ciclo celular na fase G1 (Cotran, 2000; Kumar, 2010).

Outras proteínas supressoras tumorais, como o p53 e pRb também são importantes controladoras do ciclo celular, pois impedem que a célula senescente ou defeituosa continue a se dividir, levando-a à apoptose (Singh, 2010).

Em sua forma ativa, a pRB encontra-se hipofosforilada e ligada ao fator de transcrição E2F (proteína de regulação gênica), formando um complexo ativo cuja função é estimular a transcrição de vários genes anti-proliferativos que controlam a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Wentzensen, 2004). Quando a mitose celular é estimulada, há hiperfosforilação e desligamento da pRb do E2F. O E2F livre e ativo promove a transcrição de um grupo de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular (Wentzensen, 2004).

A p53 ao pausar o ciclo celular na fase G1, estimula apoptose das células cujo DNA não foi reparado aumentando da expressão da proteína p16^{ink4A} (Eleutério, 2006).

Quando a célula cervical normal é infectada pelo HPV, há aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7, as quais alteram o mecanismo de reparo celular, imortalizando a célula infectada (Ganguly, 2009).

A proteína E7, ao inibir a atividade da pRB, aumenta a proliferação celular no epitélio infectado (Kruse, 2001), enquanto que a proteína E6 promove a degradação da p53, comprometendo a integridade do DNA, causando instabilidade cromossomal, imortalização e gerando proliferação anormal das células transformadas, favorecendo a carcinogênese (Ganguly, 2009).

Considerando que a p16^{ink4A} é uma CDKI que inibe a fosforilação da pRB e tem sua expressão controlada por feedback negativo exercido pela própria pRB, a inativação da pRB pela proteína E7 do HPV resulta no aumento da expressão da p16^{ink4A} nas células infectadas, em sua forma inativa (Singh, 2010; Wentzensen, 2004; Klaes, 2001).

Bergeron e colaboradores demonstraram, através de uma revisão bibliográfica, que a identificação da p16^{INK4A}, através de análise imunohistoquímica, incrementa substancialmente a acurácia diagnóstica nas amostras histológicas (Bergeron, 2014).

Longatto e colaboradores constataram que a p16^{ink4A} mostrou uma alta sensibilidade e um alto valor preditivo negativo nos casos de NIC 2,3 e câncer; indicando que a expressão da p16^{INK4A} aumenta com a gravidade das lesões cervicais; entretanto, esses resultados não conseguiram demonstrar sua aplicabilidade diagnóstica, visto que os resultados diferem de acordo com a prevalência da doença, numa determinada população (Longatto, 2006; Wang, 2004).

Tsompou e colaboradores, demonstraram uma forte correlação entre a positividade para p16^{INK4A} e a severidade das lesões do colo uterino, porém a reprodutibilidade do teste para p16^{INK4A} ainda é limitada devido à insuficiência na padronização da interpretação das reações de imunocoloração e à dificuldade em obter uma quantificação reprodutível dos resultados (Tsompou, 2009). Além disso, a expressão de p16^{INK4A} é bem heterogênea e varia de acordo com os diferentes graus de NICs e com o câncer cervical. Entretanto, apesar da expressão do p16^{INK4A} ser uma boa ferramenta no auxílio diagnóstico das lesões, estudos ainda são necessários para definir a verdadeira utilidade deste marcador no rastreamento do câncer de colo uterino (Vulgareva, 2004; Tsompou, 2009; Del Pino, 2009).

Uma alternativa para avaliar a expressão da p16^{INK4A} com maior sensibilidade e menor falha inerente ao método imunohistoquímico é a detecção do seu *RNAm* através de PCR em tempo real, pois além de ser mais sensível, sua análise é menos subjetiva que a morfológica (Habis, 2009). Apesar das vantagens teóricas, poucos estudos sobre esta técnica baseada em *RNAm* foram realizados no câncer de colo uterino e nas suas lesões pré-neoplásicas.

Sabendo-se da baixa sensibilidade da CCO e da necessidade do HPV para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, nosso trabalho buscou identificar quais fatores de risco são mais prevalentes entre as mulheres com alterações citológicas que evoluíram para algum grau de NIC e avaliar suas utilidades no rastreamento dessa neoplasia. Concomitantemente, propusemo-nos a testar se os marcadores biomoleculares *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16* tem a capacidade de incrementar a sensibilidade do atual modelo de rastreamento do câncer de colo uterino.

2. Objetivos

1 - Analisar se os fatores de risco podem contribuir com o aumento da sensibilidade diagnóstica do câncer de colo uterino.

2 – Avaliar se o *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16* podem aperfeiçoar o atual modelo proposto para o rastreamento do câncer de colo uterino.

3. Pacientes e Métodos

3.1 População

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho e do Conjunto Hospitalar do Mandaqui (aprovação número 38139214.8.0000.5511), no qual todas as pacientes concordaram e assinaram o termo de consentimento informado de esclarecimento antes da avaliação inicial.

No setor de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI) do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, foram atendidas 270 pacientes no período entre Junho de 2013 a Agosto de 2014, as quais foram encaminhadas pela central de vagas da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Dentre todas as pacientes atendidas, 110 foram submetidas ao exame colposcópico por apresentarem apenas alterações citológicas; destas, 75 foram selecionadas para o estudo pois além de alterações citológicas, apresentaram, ao exame colposcópico, achados anormais (Tabela 1).

Foram excluídas do estudo as pacientes encaminhadas ao setor de PTGI equivocadamente com CCO normal, ASC-US não confirmado pela segunda citologia num intervalo de 6 meses, e também as pacientes que apresentaram exame colposcópico normal, apesar da alteração citológica (Tabela 1).

Por outro lado, foram incluídas as mulheres com citologia oncológica cervical apontando ASC-US de repetição (dois resultados no intervalo de 6 meses); ASC-H LIEBG, LIEAG e AGC (Tabela 1).

Todas as pacientes selecionadas enquadraram-se rigorosamente nos critérios de inclusão ao apresentarem alterações citológicas e colposcópicas (Tabela 1).

Subdividimos as alterações citológicas em dois grupos, o primeiro grupo composto por ASC-US e LIEBG (Grupo 1) e o segundo por LIAG, ASC-H e AGC (Grupo 2) baseado na

probabilidade de cada anormalidade citológica evoluir para uma lesão histológica (Tabela 2).

Tabela 1: Critérios de Inclusão e exclusão

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
ASC-US (repetição)	Citologia oncológica cervical normal
ASC-H	ASC-US (resultado isolado)
LIEBG	Exame colposcópico normal
LIEAG	
AGC	
Exame colposcópico anormal	

Tabela 2: Agrupamento das alterações citológicas de acordo com sua associação com lesão tecidual de alto e baixo grau.

	Grupo 1	Grupo 2
	ASC-US	LIEAG
CCO	LIEBG	ASC-H
		AGC
Total	30	45

3.2 Fatores de Risco

Em relação aos fatores de risco para o câncer de colo uterino, as variáveis em questão foram: idade, etnia, tabagismo, paridade, sexarca, número de parceiros sexuais durante a vida, doenças sexualmente transmissíveis (DST), uso de contraceptivos orais combinados (COC) e uso de preservativo masculino durante o coito (Hoffman, 2014).

Cada fator de risco citado acima, foi dividido em subgrupos com maior e menor risco de desenvolver o câncer de colo uterino (Tabela 3). Em relação à etnia, as mulheres foram divididas em brancas e não-brancas, respeitando a escolha étnica pela própria pacientes.

Na sexarca, adotamos o risco aumentado a idade menor ou igual a 16 anos.

A utilização do COC não foi avaliada em relação ao tempo de uso, mas atrelado à esse fator de risco estar presente ou ausente, devido à pequena amostra populacional.

Consideramos o uso de preservativo masculino durante o coito e descartamos o histórico recente ou tardio de DST, visto que a maioria das mulheres não tinham certeza dessa informação, comprometendo nossa avaliação (Tabela 3).

A idade e o número de parceiros sexuais e a partir dos quais são necessários para elevar o risco da população feminina em questão desenvolver o câncer de colo uterino foram calculados através de uma curva ROC.

Um questionário relacionando os fatores de risco clínicos para o câncer de colo uterino e ao contágio do HPV foi criado para este projeto e aplicado, antes do início da consulta, em menos de cinco minutos, às pacientes que seriam submetidas ao exame colposcópico (Anexo I).

Tabela 3: Lista dos fatores de risco para câncer de colo uterino de acordo com a probabilidade de desenvolver a neoplasia.

Fatores de risco	Baixo risco de câncer	Alto risco de câncer
Idade	<21 anos	≥21 anos
Paridade	<4 partos	≥4 partos
Raça	Brancas	Não brancas
Tabagismo	Não tabagista	Tabagista
Sexarca	>16 anos	≤16 anos

Parceiros	≤ 1	> 1
Preservativo	Sim	Não
ACO	Não	Sim
DST	Não	Sim
CCO	Grupo 1	Grupo 2
Histologia	Baixo risco	Alto risco

3.3 Colposcopia

A colposcopia foi realizada no setor de PTGI do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, utilizando-se um colposcópio binocular (DF Vasconcellos modelo CPM-1250) de lentes convergentes, com ajustes de dioptria, filtro verde para análise de rede vascular e definição das maiores alterações para realização da biópsia e um sistema de iluminação.

Os exames colposcópicos foram realizados sempre pelo mesmo examinador, o qual é médico especialista em ginecologia e obstetrícia com experiência em PTGI.

Após a paciente estar em posição de litotomia, introduziu-se o espéculo de Collins no canal vaginal, instilou-se solução fisiológica para a retirada de secreções a fim de facilitar a visualização direta do colo uterino. O filtro verde foi utilizado para analisar a vascularização. Em seguida, o colo uterino e as paredes vaginais foram corados por ácido acético a 5% com chumaços de algodão. Após cinco minutos iniciou-se o exame colposcópico propriamente dito na tentativa de detectar lesões anormais no colo do útero.

Utilizou-se solução de Lugol para delimitar áreas iodo-negativas (Teste de Schiller).

Os aspectos colposc6picos foram baseados nos estabelecidos pelo comit6 de nomenclaturas da Internacional *Society of Cervical Pathology an Colposcopy*, durante o 11° Congresso Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia, realizado em Barcelona no ano de 2002 (Walker, 2003), sendo:

- I. Achados Colposc6picos Normais:
 - o Epit6lio Escamoso Original
 - o Epit6lio Colunar
 - o Zona de Transforma73o

- II. Achados Colposc6picos Anormais:
 - o Epit6lio aceto branco leve
 - o Epit6lio aceto branco plano ou denso
 - o Mosaico fino ou grosseiro
 - o Pontilhado fino ou grosseiro
 - o Iodo Negativo
 - o Superf6cie irregular, eros3o ou ulcera73o
 - o Iodo parcialmente positivo
 - o Vasos at6picos

Todas as imagens anormais foram biopsiadas mediante uso de pin73as Gaylor-Medina. O material foi repartido em duas metades, sendo que uma delas foi mergulhada em formalina 10%, em frasco bem fechado e enviado ao laborat6rio para an6lise anatomopatol6gica, enquanto a outra foi submersa numa solu73o de RNA later® , num

frasco fornecido pelo fabricante e congelado à uma temperatura de - 90°C para posterior análise molecular.

As amostras histológicas que apontaram tecido normal, NIC I, II e III, foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo, definido como baixo risco (n=59) para câncer de colo do útero, foi composto por amostras histológicas de tecido normal e NIC I; enquanto que o grupo de alto risco (n=16) foi representado por amostras histológicas de NIC II e NIC III (Tabela 4).

Tabela 4: Agrupamento das lesões histológicas de acordo com a probabilidade de evolução para o carcinoma de colo uterino.

	Baixo risco	Alto risco
Histologia	Tecido Normal NIC I	NIC II NIC III
Total	59	16

3.4 Marcadores Biomoleculares - Expressão de RNAm p16^{INK4a} e IDO

3.4.1 Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o produto comercial TRIZOL® (Life technologies), que consiste em um reagente pronto para uso no isolamento de RNA total de células e tecidos. O TRIZOL® constitui de uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato.

Durante a homogeneização ou lise da amostra, o TRIZOL® mantém a integridade do RNA enquanto rompe às células e dissolve os componentes celulares. A adição de clorofórmio seguida de centrifugação separa a solução em fases aquosa e orgânica, o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, depois da transferência da fase aquosa para um novo tubo, o RNA total é recuperado por precipitação com isopropanol. Essa técnica apresenta bons resultados com pequenas quantidades de tecidos (100mg).

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (*NanoDrop, Thermo Scientific, EUA*), medindo-se a densidade óptica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em µg/mL, a partir da absorbância à 260nm.

A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 µg/mL. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

A integridade do RNA total foi avaliada pela observação da proporção das bandas referentes aos rRNA 18S e 28S em eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Life technologies).

3.4.2 RT-PCR em Tempo Real

A reação de síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit comercial High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, EUA). Duzentos nanogramas de RNA total contidos em 9µL de água livre de RNase foram misturados a 10 µL de 2X RT Buffer e a 1 µL de 20x Enzyme Mix, totalizando 20µL. A mistura foi aquecida a 37°C por 60 minutos e a 95°C por 5 minutos. Após a reação, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Para a PCR, foram confeccionados pares de primers para a obtenção de amplicons com no máximo 250 pb, conforme recomendação para PCR em tempo real. Estes primers

foram também submetidos ao RT-PCR convencional para validação da temperatura de anelamento. Os primers utilizados estão apresentados na Tabela 5.

Para a PCR em tempo real foi utilizado o kit Syber Mix (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um microlitro de cDNA foi acrescido de 19µL de PCR Sybr Mix, acrescidos dos primers específicos. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A mistura foi aquecida a 50°C por 10 minutos e depois a 95°C por 5 minutos, seguindo para 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de melting foi feita à 65°C, com variação de 1°C. O equipamento utilizado foi o 7500™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

Tabela 5: Primers utilizados para RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional (detecção do HPV).

Gene alvo	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
IDO	CCTGGGGTACATCACCATGGCG	TTGCGGGGCAGCACCTTTTCG
P16	GGGABAACAGAGACAACGGGC	ACCTCCTCTACCCGACCCC
HPV16E6	TAAACTAAAGGGCGTAACCG	TCTATTTTCATCCTCCTCCTCTG
HPV16E7	ACTGTCTCCTGAAGAAAAGCAA	AACCATCCATTACATCCGT
HPV18E6	TAGGTTGGGCAGCACATACT	ATACTTGTGTTTCTCTGCGTCG
HPV18E7	CGACGCAGAGAAACACAAGTAT	ATTGTTGCTTACTGCTGGGAT

4. Análise Estatística

A análise de regressão logística foi realizada nas variáveis clínicas (fatores de risco) e citológicas em busca da sua associação com o resultado anatomopatológico. A proporção de variação explicada (PVE) por cada um dos fatores de risco foi calculada pela fórmula ômega, enquanto que a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo

e o valor preditivo negativo foram calculados pelas fórmulas de Galen e Gambino (Galen, 1976). Foi considerado significativo um $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Resultados dos Objetivo 1

Foram incluídas 75 pacientes com idade entre 17 a 67 anos (mediana de 34 anos) com alterações citológicas e colposcópicas, conforme os critérios de inclusão (Tabela 1). As variáveis relacionadas ao aumento do risco de câncer de colo uterino sem valor de corte estabelecido pela literatura foram calculadas através de uma curva ROC relacionando os fatores de risco em questão com os resultados anatomopatológicos. O ponto de corte encontrado para a idade foi de 21 anos em nossa população, sendo que houve predominância de idade maior ou igual a 21 anos (68 mulheres ou 90,6%) (Tabela 6).

A mediana do número de parceiros sexuais referido pelas pacientes foi de três, sendo o ponto de corte calculado para esta variável de 2 parceiros ou mais. Apenas 13/75 das mulheres (17,3%) mantiveram relação sexual com apenas um parceiro (Tabela 6). Quanto à etnia, houve predomínio de mulheres brancas (41/75 mulheres, 56,6%) (Tabela 6). O número de não tabagistas (52/75 mulheres, 69,3%) foi significativamente maior que as tabagistas (Tabela 6).

Enfocando os antecedentes ginecológicos-obstétricos, a paridade da maioria das pacientes analisadas esteve abaixo de 4 (63/75 mulheres, 84,0%). A sexarca com idade menor ou igual a 16 anos foi mais observada (37/75 mulheres, 49,3%). O número de mulheres que afirmaram usar preservativo durante o coito foi baixo (17/75 mulheres, 22,6%), associado ou não ao método contraceptivo oral hormonal combinado (Tabela 6).

Complementando o exposto acima, analisamos a prevalência dos grupos clínicos de maior risco de acordo com seu respectivo resultado histológico (Tabela 7).

Em relação à citologia, a maioria foi representada por mulheres do grupo 2 (45/75 pacientes, 60,0%), composto por ASC-H, AGC e LIEAG, enquanto que a análise histológica comprovou que a maioria das biópsias (59/75 pacientes, 78,0%) não mostrou lesão tecidual precursora do câncer de colo uterino, mas tecido cervical normal e/ou NIC I (Tabela 6).

Avaliamos, também, a correlação entre as imagens colposcópicas e o resultado da análise anatomopatológica das biópsias (Tabela 8). Observamos que as amostras de tecido cervical normal teve maior associação com os achados compatíveis com epitélio aceto branco leve (22/50 biópsias, 44,0%), seguido de pontilhados finos (17/50 biópsias, 34,0%). As NICs I correlacionaram-se igualmente com o mosaico fino e imagens iodo parcialmente positivas (3/9 biópsias, 33,4%), seguido de imagens aceto brancas leves

(2/9 biopsias, 22,3%). As NICs II associaram-se às imagens iodo negativas (4/14 biopsias, 30,8%) seguidas em igualdade pelas imagens aceto brancas densas e mosaico grosseiro em igual proporção (3/14 biopsias, 23,1%). Por fim, as NICs III correlacionaram-se com as imagens iodo negativas e presença de vasos atípicos em igual proporção (1/2 biopsias, 50,0%) (Tabela 8).

Em uma análise mais detalhada da relação entre as lesões histológicas e os tipos de alterações citológicas, observamos que no tecido cervical normal, as ASC-H foram mais prevalentes (16/50 biopsias, 32,0%), seguidas das LIEBG (12/50 biopsias, 24,0%) e das ACG (10/50 biopsias, 20,0%). Nas NICs I, as LIEBG (5/9 biopsias, 55,6%) foram maioria, seguidas das ASC-US (2/9 biopsias, 22,3%) e das LIEAG e ACG em igual proporção (1/9 biopsias, 11,2%). Entre as NICs II, as ASC-H e as LIEAG foram mais prevalentes (6/14 biopsias, 42,9% e 5/14 biopsias, 35,8%), respectivamente. Por fim, todas as NIC III estiveram associadas às LIEAG (2/2 biopsias, 100%) (Tabela 9).

Tabela 6: Análise descritiva dos dados relacionados ao aumento do risco de câncer de colo uterino e suas lesões precursoras baseado na frequência de cada grupo.

Fatores de risco	Grupos	Frequência	Percentual
Idade	<21 anos	7	9,4
	≥21 anos	68	90,7
Paridade	<4 partos	63	84,0
	≥4 partos	12	16,0
Etnia	Branças	41	54,7
	Não brancas	34	45,4
Tabagismo	Não tabagista	52	69,4
	Tabagista	23	30,7
Sexarca	>16 anos	38	50,7

	≤16 anos	37	49,4
Parceiros	= 1	13	17,4
	> 2	61	81,4
	Não sabem	1	1,4
Preservativo	Não	58	77,4
	Sim	17	22,7
COC	Não	54	72,0
	Sim	21	28,0
CCO	Grupo 1	30	40,0
	Grupo 2	45	60,0
Histologia	Baixo risco	59	78,7
	Alto risco	16	21,4

Tabela 7: Prevalência dos fatores de risco de acordo com o resultado histológico.

3	Tecido cervical normal		NIC 1		NIC 2		NIC	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Idade	4	92,0	6	66,7	14	100,0	2	100,0
	6							
Paridade	8	16,0	1	11,2	2	14,3	1	50,0
Etnia	2	44,0	4	44,5	7	50,0	2	100,0
	2							
Tabagismo	1	32,0	1	11,2	5	35,8	1	50,0
	6							
Sexarca	2	52,0	4	44,5	6	43,0	1	50,0
	6							
Parceiros	4	80,0	6	66,7	13	93,0	2	100,0
	0							
Preservativo	1	26,0	-	-	4	28,6	-	-
	3							

COC	1	22,0	2	22,3	7	50,0	1	50,0
	1							

Tabela 8: Relação entre as imagens colposcópicas e o resultado da análise anatomopatológica das biopsias.

	Tecido cervical normal		NIC I		NIC II		NIC III	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Epitélio aceto branco leve	22	44,0	2	22,3	-	-	-	-
Epitélio aceto branco plano	-	-	1	11,2	-	-	-	-
Epitélio aceto branco denso	-	-	-	-	3	23,1	-	-
Mosaico fino	8	16,0	3	33,4	-	-	-	-
Mosaico grosseiro	-	-	-	-	3	23,1	-	-
Pontilhado fino	17	34,0	-	-	-	-	-	-
Pontilhado grosseiro	-	-	-	-	2	15,4	-	-
Superfície irregular	-	-	-	-	1	7,7	-	-
Superfície erosiva	-	-	-	-	-	-	1	50,0
Superfície ulcerada	-	-	-	-	-	-	-	-
Iodo Negativo	-	-	-	-	4	30,8	-	-
Iodo parcialmente positivo	3	6	3	33,4	-	-	-	-
Vasos atípicos	-	-	-	-	1	7,7	1	50,0

Tabela 9: Relação entre os achados histológicos e suas alterações citológicas

Total	ASC-US		ASC-H		LIEBG		LIEAG		AGC		n
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Tecido normal	9	16,0	16	34,0	12	24,0	3	6,0	10	20,0	50
NIC 1	2	22,3	-	-	5	55,6	1	11,2	1	11,2	9
NIC 2	-	-	6	42,9	2	14,3	5	35,8	1	7,2	14
NIC 3	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2
Total	11	13,4	22	30,7	19	25,4	11	14,7	12	16,0	75

Observamos que as pacientes com alterações na CCO do Grupo 2 tiveram maior chance de cursar com lesões histológicas de alto grau (OR:13,10 e IC95%: 1,80 a 94,40).

As alterações citológicas apresentaram uma maior chance para a detecção de lesões de alto risco do que qualquer outro fator de risco.

O uso de COC (OR: 7,20 e IC95%: 1,40 a 35,10) e o número de parceiros sexuais (OR:3,70 e IC95%: 0,30 a 46,00) também aumentaram a chance de lesões de alto grau, porém em menor proporção que a citologia (Tabela 10).

Em contrapartida, a chance foi menor nas pacientes que faziam uso de preservativo masculino (OR:0,50 e IC95%: 0,08 a 2,61), sexarca (OR:0,65 e IC95%: 0,15 a 3,00) e tabagismo (OR:0,71 e IC95%: 0,15 a 3,40).

Tabela 10: Associação dos fatores de risco e alterações histológicas

Fator de risco	Significância	OR	IC95%
Idade	0,20	1,90	*
Paridade	0,80	1,82	0,30 - 11,10
Raça	0,30	2,62	0,63 - 10,90
Tabagismo	0,45	0,71	0,15 - 3,40
Sexarca	0,70	0,65	0,15 - 2,96
Parceiros	0,20	3,70	0,30 - 46,00
Preservativo	0,82	0,50	0,08 - 2,61
COC	0,03	7,20	1,50 - 35,10
CCO	0,01	13,10	1,80 - 94,40

* não foi possível calcular o intervalo de confiança baseado na amostra atual.

A proporção de variância explicada (PVE) dos diferentes fatores de risco foi calculado, sendo que esta medida está relacionada à chance atribuída aos fatores de risco conhecidos em atingir o desfecho esperado. A interpretação do PVE é semelhante ao R-quadrado na regressão linear.

Na amostra populacional estudada, a CCO apresentou o maior poder de predição das lesões de alto grau (VPE: 44,6%), seguido do uso de COC (VPE: 33,7%), idade (VPE:14,2%) e número de parceiros sexuais (VPE: 12,4%). Em contrapartida, o uso de preservativos masculinos (VPE: 0,5%) e a paridade (VPE: 0,8%), não se mostraram bons parâmetros preditores (Tabela 11).

A associação entre os fatores de risco e a CCO (índice ACO+CCO) mostrou um alto poder de predição para lesões de alto grau (VPE: 100,9%); enquanto que o índice CCO+FR (citologia somada à todos os fatores de risco) também melhorou o poder de predição, porém em menor proporção (VPE: 99,9%) (Tabela 11).

Tabela 11: Poder de predição das lesões histológicas de alto grau de cada fator de risco isolado e associados entre si

Fator	VPE
Idade	14,2
Paridade	0,8
Raça	6,6
Tabagismo	2,9
Sexarca	1,7
Número de Parceiros	12,4
Preservativo	0,4
ACO	33,7
Citologia	44,7
ACO + Citologia	100,9
CCO + FR	99,9

5.2 Resultados do Objetivo 2

Para o processo da análise biomolecular, apenas 25 amostras apresentaram material genético suficiente para avaliação, das quais 5 eram tecido cervical normal, 8 eram NIC I, 10 eram NIC II e 2 eram NIC III.

Nesta análise, o *RNAm IDO* aumentou sua expressão de acordo com a progressão das NICs (NIC III > NIC II > NIC I > tecido cervical normal), ao passo que a expressão gênica do *RNAm CDKN2A/p16* diminuiu sua expressão de acordo com a progressão das lesões pré neoplásicas.

Ao comparar os métodos moleculares com a CCO, pudemos observar que a citologia apresentou maior especificidade dentre todos os métodos, enquanto que o *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16* foram mais sensíveis, detectando as lesões histológicas imperceptíveis pela CCO.

Comparando a sensibilidade e especificidade do *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16* com a CCO, observamos que isoladamente a IDO apresentou a maior sensibilidade e valor preditivo negativo (VPN) (91,0% e 83,4%) em relação ao *RNAm CDKN2A/p16* e a CCO (Tabela 12).

A associação do *RNAm CDKN2A/p16* com a citologia aumentou a sensibilidade e o VPN (91,7% e 85,8%) em relação à combinação entre o *RNAm IDO* e a CCO (91,0% e 83,4%) (Tabela 12).

Tabela 12: Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN dos biomarcadores moleculares e da CCO de forma isolada e associada, partindo-se de um Pré - teste de 48%

	Pré-Teste	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Citologia	48	41,7	92,4	83,4	63,2
<i>RNAm CDKN2A/p16</i>	48	75,0	54,0	60,0	70,0
<i>RNAm IDO</i>	48	91,0	41,7	59,0	83,4
CCO + <i>RNAm CDKN2A/p16</i>	48	91,7	46,2	61,2	85,8
CCO + <i>RNAm IDO</i>	48	91,0	41,7	59,0	83,4
CCO + <i>RNAm IDO</i> e o <i>RNAm CDKN2A/p16</i>	48	83,4	69,3	71,5	82,0

O cálculo da (PVE) do *RNAm CDKN2A/p16*, do *RNAm IDO* e da citologia de forma isolada, mostrou que a CCO foi o método com maior poder de predição de lesões

precursoras (PVE: 85,8%), seguida do *RNAm IDO* (PVE: 73,8%) e do *RNAm CDKN2A/p16* (PVE: 45,3%) (Tabela 13).

A combinação entre a CCO e o *RNAm CDKN2A/p16* aumentou o poder de predição da citologia quando usada de forma isolada (PVE: 97,2%), ao passo que sua associação com o *RNAm IDO* não foi superior ao seu uso isolado (PVE: 73,8%) (Tabela 13).

Por fim, a melhor combinação foi entre a CCO, o *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16*, pois o poder de predição foi duplicado (PVE: 162,8%) (Tabela 13).

Tabela 13: Poder de predição das lesões histológicas de alto grau da COC e de cada biomarcador molecular isolado e associados entre si.

Fator	PVE
Citologia	85,8
<i>RNAm CDKN2A/p16</i>	45,3
<i>RNAm IDO</i>	73,8
Citologia + <i>RNAm CDKN2A/p16</i>	97,2
Citologia + <i>RNAm IDO</i>	73,8
Citologia + <i>RNAm IDO</i> e o <i>RNAm CDKN2A/p16</i>	162,8

6. Discussão

Este trabalho teve o intuito de buscar novas ferramentas que pudessem aperfeiçoar o rastreamento do câncer de colo uterino. Avaliamos os fatores de risco clínicos, a CCO e os biomarcadores moleculares *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16*.

Considerando que o câncer de colo uterino é uma neoplasia cujo agente etiológico indispensável para carcinogênese é o HPV, sabemos que o diagnóstico e o tratamento precoce pode curar 100% dessas pacientes (Bauer, 1991; Koutsky, 1992).

Embora o Brasil tenha sido um dos primeiros países a implantar um programa de rastreio, através de exames periódicos de CCO, essa neoplasia permanece com uma elevada prevalência (INCA, 2014).

Todas as pacientes encaminhadas pela central de vagas da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo foram atendidas e selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

O questionário elaborado baseado nos critérios clínicos foi aplicado à todas as mulheres que apresentavam alterações citológicas de acordo com os critérios de inclusão. As mulheres que não apresentaram alterações colposcópicas tiveram seu questionário descartado.

Observamos que a maioria das pacientes com alterações citológicas tinham uma mediana de idade de 34 anos, coincidindo com a faixa etária a partir da qual há maior incidência desse câncer, devido ao fato do sistema imune da mulher com mais de 30 anos ser menos efetivo na eliminação do HPV, enquanto que o sistema imune das mulheres com idade abaixo de 21 anos é mais eficaz na realização desta função (ACOG, 2009).

Concluimos que a idade de 21 anos coincidiu com o resultado obtido através do cálculo da nossa curva ROC, comprovando que esta amostra populacional foi suficiente para comprovar os dados literários.

Em relação à paridade, a maioria das mulheres com lesões de alto grau pariram menos de 4 vezes, contradizendo alguns estudos (Murta, 1999 e Muñoz, 2002). Tal fato apoia que a paridade não deve ser usada como um fator de risco significativo no rastreio do câncer de colo uterino, uma vez que os dados literários são escassos, antigos, controversos e mudam de acordo com a população estudada.

As pacientes de etnia branca com lesões de alto grau foram maioria, o que não apoia os achados literários que estabelecem as mulheres de etnia não-branca como mais susceptíveis ao câncer de colo uterino (Mascarello, 2013). Esse viés pode ser explicado pelo fato de mais de 50,0% das mulheres serem brancas e também pelo fato da própria paciente determinar sua etnia, o que nem sempre corresponde a interpretação da maioria da população.

Nesta casuística, mais de 69,0% da amostra foi composta por mulheres não tabagistas.

Por isso, as tabagistas com lesões histológicas de alto grau foram minoria. Podemos considerar que essa discordância com a literatura pode estar relacionada ao período de tempo e ao número de cigarros tragados pela paciente durante sua vida e não somente ao fato da mulher ser tabagista ou não (Plummer, 2003; Castle, 2004).

Em relação a sexarca, não houve diferença estatística significativa entre o grupo de mulheres que iniciaram a vida sexual abaixo e acima dos 16 anos; apesar da coitarca precoce (<16 anos) ser considerada um importante fator de risco. Essa discordância nos faz crer que o fato da paciente ter iniciado precocemente sua vida sexual não significa, necessariamente, que estará mais susceptível ao contágio e ação do HPV. Devemos considerar que mulheres com coitarca precoce podem se monogâmicas, enquanto que as mulheres com sexarca tardia podem não ter o hábito de manter relação sexual apenas com um parceiro, diferenciando as chances de serem contaminadas por cepas oncogênicas do HPV, respectivamente.

Partindo-se do pressuposto que o uso de preservativo masculino durante o coito é um fator de proteção contra a transmissão do HPV, seu uso rotineiro não se mostrou um hábito das mulheres que compuseram nossa amostra. Por isso, a pesquisa desse fator de risco pouco contribuiu com a detecção das lesões histológicas de alto grau.

A multiplicidade de parceiros sexuais é tida como um importante fator de risco para o câncer de colo uterino; porém, ainda não é estabelecido o número exato de parceiros necessários para aumentara chance de contrair o HPV e desenvolver uma lesão de alto grau (FEBRASGO, 2010). Em nossa análise, através da curva ROC, concluímos que esse número é próximo à 2 parceiros. Isso significa que esse fator de risco não é um bom método de triagem, visto que a maioria das mulheres da nossa amostra mantiveram relação sexual com mais de um homem durante a vida. Entretanto, o questionamento dessa variável promove um desconforto nas mulheres por questões culturais, favorecendo uma possível subnotificação.

Como sabemos, o uso de contraceptivos orais estão relacionados ao aumento das lesões de alto grau e ao câncer de colo uterino (Moreno, 2002). Neste estudo, o número de mulheres que faziam uso do método e apresentaram lesões de alto grau foi bem considerável, principalmente por apresentar o melhor poder de predição (PVE: 33,7%) quando comparado aos demais fatores de risco.

Corroborando com os dados da literatura, a CCO preconizada pelo Ministério da Saúde como principal método de rastreamento mostrou-se como método mais eficaz na identificação da mulheres com lesões histológicas de alto grau, independentemente dos demais fatores de risco.

Com intuito de aperfeiçoar os programas de rastreamento do câncer de colo uterino, propusemos dois novos "índices" criados a partir da associação dos fatores de risco com a CCO. Observamos que o índice COC+CCO mostrou um poder de predição para lesões de alto grau maior que todos os fatores de risco isolados. Isso significa que o COC parece ser o fator de risco mais relevante a ser considerado no rastreamento quando associado à CCO.

Diante do exposto até o momento, podemos dizer que a citologia oncológica cervical convencional foi o melhor método empregado na detecção das lesões de alto grau quando comparada aos fatores de risco para o contágio do HPV. As informações sobre todos os fatores de risco e principalmente sobre o uso de contraceptivos elevaram o poder de predição das lesões de alto grau. Entretanto, as usuárias dos contraceptivos merecem uma atenção especial durante o rastreamento do câncer de colo uterino, visto que somente essa informação poderia ser suficiente para detectar as lesões de alto grau.

A ineficiência do rastreio proposto pelo Ministério da Saúde também se deve à não adesão das pacientes ao programa devido à desmotivação relacionada a periodicidade requerida pela CCO, fazendo com que a maioria das mulheres não realizem a citologia no intervalo de tempo recomendado. O resultado disso é o diagnóstico das lesões pré-neoplásicas e do câncer em estádios avançados, comprometendo o tratamento, a cura e a sobrevida da doente.

Diante da necessidade de desenvolvermos métodos mais sensíveis para o diagnóstico do câncer de colo do útero, analisamos a eficácia de dois biomarcadores moleculares, *RNA^m IDO* e o *RNA^m CDKN2A/p16*, no rastreamento dessa neoplasia.

Baseado no fato da IDO promover um ambiente propício para o desenvolvimento tumoral, ao driblar o sistema imune, observamos que sua expressão aumentou proporcionalmente à progressão da lesão tecidual, confirmando seu potencial diagnóstico e prognóstico (Kobayashi, 2008; Godin-Etheier, 2011). Esses resultados foram condizentes com os achados literários.

Apesar da maioria dos estudos sobre a IDO, no trato genital feminino, estar relacionado com o prognóstico da paciente com o câncer propriamente dito, seu emprego no rastreamento do câncer de colo uterino ainda é incerto (Sato, 2012).

Observamos, ainda, que o *RNAm IDO* mostrou-se um bom marcador na detecção das lesões pré-neoplásicas de alto grau, visto que sua sensibilidade atingiu 91,0% quando empregada de forma isolada e até mesmo de forma conjunta com a CCO. Além disso, seu poder de predição para o carcinoma de colo uterino foi maior que 70,0%, confirmando seu potencial diagnóstico e preditor.

Em relação ao *RNAm CDKN2A/p16*, sua expressão variou de acordo com o grau das NICs, uma vez que seus valores tendem a diminuir de acordo com a progressão das lesões precursoras, sendo muito expresso em tecido normal e pouco expresso no NIC III, mimetizando um fator de proteção.

O resultado da expressão gênica do *RNAm CDKN2A/p16* difere da expressão da proteína p16^{INK4A}, uma vez que a análise imunohistoquímica mostra um aumento proporcional à progressão das lesões pré-neoplásicas (Longatto, 2006; Wang, 2004).

Devemos ressaltar que o método imunohistoquímico analisa apenas uma área tecidual e não representa toda amostra, explicando a diferença entre a expressão do *RNAm CDKN2A/p16* e a proteína propriamente dita (Tsoumpou, 2009; Del Pino, 2014).

Apesar da baixa especificidade do *RNAm CDKN2A/p16*, observamos uma alta sensibilidade (>70,0%), sugerindo que o uso desse marcador deve ser considerado no rastreamento, apesar de seu baixo poder de predição.

Ao comparar os métodos moleculares com a CCO, comprovamos que a especificidade citológica é indiscutivelmente superior aos métodos moleculares isolados. Por outro lado, observamos que o *RNAm IDO* e o *RNAm CDKN2A/p16* foram capazes de identificar lesões histológicas que não foram detectadas pela CCO, confirmando sua sabida baixa sensibilidade. Entretanto, a associação entre a CCO, *RNAm CDKN2A/p16* com o *RNAm IDO* mostrou um aumento considerável da sensibilidade do rastreamento.

Em uma análise mais detalhada e partindo de um pré-teste de 48%, concluímos que isoladamente o *RNAm IDO* apresentou a maior sensibilidade e maior VPN (91,0% e 83,4%) em relação ao *RNAm CDKN2A/p16* e a CCO.

Quando associamos o *RNAm CDKN2A/p16* com a citologia, aumentamos a sensibilidade e o VPN (91,7% e 85,8%) em relação à combinação entre o *RNAm IDO* e a CCO (91,0% e 83,4%).

Contudo, os melhores resultados foram obtidos através da combinação entre o *RNAm IDO*, o *RNAm CDKN2A/p16* e a CCO, na qual elevamos a sensibilidade do método de rastreio para mais de 80,% sem perder tanto em especificidade (70,0%). Além disso, essa combinação mostrou um poder de predição maior que 160,0%, demonstrando que o uso dessa associação deve ser levada em consideração nos programas de rastreamento do câncer de colo uterino.

7. Conclusão:

Em relação à identificação dos fatores de risco para o câncer de colo uterino e aos marcadores biomoleculares, concluímos que:

- A informação sobre o uso dos contraceptivos orais foi útil e elevou o poder de predição das lesões de alto grau e, por isso, merece ser levada em consideração durante a coleta do exame citológico, visto que a aplicação de um simples questionário pode agregar um considerável valor de predição no protocolo de rastreamento do câncer de colo uterino do Ministério da Saúde
- Isoladamente, a CCO foi o método mais específico empregado na detecção das lesões de alto grau.

- Tanto o *RNAm IDO* quanto o *RNAm CDKN2A/p16* tem a capacidade de detectar precocemente as lesões precursoras não identificadas pela CCO.
- Associados à CCO ou usados de forma isolada, tanto o *RNAm IDO* quanto o *RNAm CDKN2A/p16* agregaram sensibilidade sem grandes perdas na sensibilidade durante o rastreamento do câncer de colo uterino.
- Devido à alta sensibilidade desses marcadores biomoleculares, tanto *RNAm IDO* quanto o *RNAm CDKN2A/p16* aumentaram consideravelmente a sensibilidade e, num primeiro momento, poderiam substituir a citologia convencional no rastreamento do câncer de colo uterino.

8. Bibliografia

1. Abrão, F. S.; Coelho, F.R.G. Princípios e cuidados Gerais em Cirurgia Oncológica Ginecológica. In Abrão, F. S. Editores. Tratado de oncologia genital e mamária. São Paulo: Rocca; 1995, p. 129-39
2. Agency for Health Care Policy and Research: Evaluation of Cervical Cytology. Summary. Evidence Report/Technology Assessment: Number 5. <http://www.ahrq.gov/clinic/epcsums.htm>. Accessed July 2013.
3. Amaral CM, Cetkovská K, Gurgel AP, Cardoso MV, Chagas BS, Paiva Júnior SS, et al. MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. *Infect Agent Cancer*. 2014;9:24.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists: Cervical cytology screening. Practice Bulletin No. 109, December 2009.

5. Apgar BS; Brotzman GL; Spitzer M. Colposcopy Principles and Practice: An Integrated Textbook and Atlas. Philadelphia: WB Saunders; 2002.
6. Arbyn, M. et al. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*, v. 111, n. 1, p. 167-77, Jan 2008. ISSN 0029-7844. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165406> >.
7. Ball, H. J.; Yuasa, H. J.; Austin, C. J. D.; Weiser, S.; Hunt, N. H. Indoleamine 2,3- dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 41, n. 3, p. 467-471, 2009.
8. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472–477.”
9. Berek, Jonathan S. Berek & Novak’s Gynecology. 15. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
10. Bergeron, C. et al. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: An update of recent developments. *Int J Cancer*, Apr 2014. ISSN 1097-0215. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740700> >.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação do câncer do colo do útero e Sistema de Informação do câncer de mama. Disponível em <http://w3.datasus.gov.br/siscam/index.php?area=0401> (acessado em 21/12/2013).

12. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 2005;106:2375–81.
13. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, et al: Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol* 130:486, 1989
14. Cantor SB, Cárdenas-Turanzas, M, Cox DD, et al: Accuracy of colposcopy in the diagnostic setting compared with the screening setting. *Obstet Gynecol* 111:7, 2008.
15. Castle PE: Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *J Low Genit Tract Dis* 8(3):224, 2004.
16. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
17. Cuzick J et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*. 2008; 26 (Suppl 10):K29-41.
18. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119:1095, 2006.
19. Demers AA, Shearer B, Severini A, Lotocki R, Kliewer EV, Stopera S, et al. Distribution of human papillomavirus types, cervical cancer screening history, and risk factors for infection in Manitoba. *Chronic Dis Inj Can*. 2012;32(4):177-85.

20. De Sanjosé S, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, New York, v.7 n.7, p.453-459, jul. 2007.
21. DeSantis, T. et al. Spectroscopic imaging as a triage test for cervical disease: a prospective multicenter clinical trial. **J Low Genit Tract Dis**, v. 11, n. 1, p. 18-24, Jan 2007. ISSN 1089-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194946> >.
22. De Villiers, E. M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. **Int J Cancer**, v. 103, n. 6, p. 705-8, Mar 2003. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12516087> >.
23. Del Pino M, Garcia S, Fuste V, et al. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:488–7.
24. Del Pino, M. et al. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer. *Mod Pathol*, Sep 2014. ISSN 1530-0285. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189639> >.
25. Dioxygenase and acquired immune privilege. *International Reviews Immunology*, v. 2, p. 133-155, 2010
26. Dunton CJ. Management of atypical glandular cells and adenocarcinoma in situ. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2008; 35(4): 623-32.

27. Edmonds, D. K. Dewhurst's textbook of obstetrics and gynecology. 7.ed.
London: Blackwell Publishing; 2007.
28. Eleutério Junior J, Giraldo PC, Gonçalves AK. Marcadores
imunoistoquímicos de lesões precursoras do câncer de colo uterino
associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16ink4a.
DST J Bras Doenças Sex Transm. 2006;18(1):62-5.
29. Focchi J; Mesquita J; Campaner AB; Yoneda YA. Colposcopia nas infecções
por HPV in Coelho FRG, Soares FA, Focchi J, Fregnani JHTG, Zeferino LC,
Villa LL, Federico MH; Novaes PERS, Costa RLR,. Câncer do colo do útero.
São Paulo, Tecmed, 282-292, 2008.
30. Fotopoulou, C. et al. Systemic changes of tryptophan catabolites via the
indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in primary cervical cancer. Anticancer
Res, v. 31, n. 8, p. 2629-35, Aug 2011. ISSN 1791-7530. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778315> >.
31. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 e E7 onco proteins as risk
factors for tumorigenesis. J Biosci. 2009;34:113-23.
32. Godin-Ethier, J. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human
cancers: clinical and immunologic perspectives. Clin Cancer Res, v. 17, n.
22, p. 6985-91, Nov 2011. ISSN 1078-0432. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068654> >.
33. Habis AH, Vernon SD, Lee DR, et al. Molecular quality of exfoliated cervical
cells: implications for molecular epidemiology and biomarker discovery.
Cancer Epide- miol Biomarkers Prev 2004;13:492–496.

34. Haghshenas M, Golini-Moghaddam T, Rafiei A, Emadeian O, Shykhpour A, Ashrafi GH. Prevalence and type distribution of high-risk human papillomavirus in patients with cervical cancer: a population-based study. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):20.
35. Hoffman, L.; Schorge, B.; Halvorson, O.; Bradshaw, M.; Cunningham, D.; Gary. *Ginecologia de Williams, 2nd Edition*. ArtMed, 01/2014.
36. Huang, G.; Zeng, Y.; Liang, P.; Zhou, C.; Zhao, S.; Hunag, X.; Wu, L.; He, X. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Downregulates the Cell Surface Expression of the CD4 Molecule. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 9, p. 10863-10879, 2012.
37. HUANG, L. et al. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. **Int Rev Immunol**, v. 29, n. 2, p. 133-55, Apr 2010. ISSN 1563-5244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20367139> >.
38. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Volume 10. Cervix Cancer Screening. 2005. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/prev/handbook10/index.php>
39. Inaba, T. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. *Gynecol Oncol*, v. 117, n. 3, p. 423-8, Jun 2010. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20350764> >.
40. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação-Geral de

Prevenção e Vigilância, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>, 2014.

41. International Agency for Research on Cancer: Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 83. 2004. Available at:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/mono83.pdf>. Accessed December 27, 2010.

42. International Agency of Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. Lyon: WHO; IARC, 2007. 636p. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 90).

43. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer: Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16573 women with cervical cancer and 35509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 370:1609, 2007

44. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *International journal of cancer*, Genenr, v. 118, n.6, p. 1481-1495, mar. 2006.

45. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277, 2010.

46. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(2):101-6.
47. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U *et al.* Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276-84.
48. Kobayashi, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*, v. 1, n. 5, p. 412-20, Sep 2008. ISSN 1935-3456. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079205> >.
49. Koshiol J, Schroeder J, Jamieson DJ, Marshall SW, Duerr A, Heilig CM, et al. Smoking and time to clearance of human papillomavirus infection in HIV-seropositive and HIV-seronegative women. *Am J Epidemiol.* 2006;164(2):176-83.
50. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1272–1278.”
51. Krause P, Singer E, Darley PI, Klebensberger J, Groettrup M, Legler DF. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J Leukoc Biol* 2007;82:1106–14.

52. Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ *et al.* Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.* 2001;193: 48-54.
53. Kudo, Y.; Boyd C. A. R.; Spyropoulou, I.; Redman, C. W. G.; TakiKawa, O.; KATSUKI, T.; HARA, T.; OHAMA, K.; SARGENT, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 61, p. 87-98, 2004.
54. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell RN. Robbins: patologia básica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
55. LIN, J. *et al.* Prognostic significance of overexpressed p16INK4a in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, v. 9, n. 9, p. e106384, 2014a. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25188353> >.
56. Lindström, V.; Aittoniemi, J.; Jylhävä, J.; Eklund, C.; Hurme, M.; Paavonen, T.; Oja, S.S.; Itälä-Remes, M.; Sinisalo, M. Indoleamine 2,3- dioxygenase activity and expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, v. 12, n. 5, p. 363-5, 2012.
57. Liu, X. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, v. 9, n. 8, p. 938-52, Dec 2009. ISSN 1873-5576. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025603> >.
58. Longatto-Filho, A. *et al.* The association of p16(INK4A) and fragile histidine triad gene expression and cervical lesions. *J Low Genit Tract Dis*, v. 11, n. 3,

p. 151-7, Jul 2007a. ISSN 1089-2591. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596760> >.

59. Lonky NM. Risk factors related to the development and mortality from
invasive cervical cancer clinical utility and impact on prevention. *Obstet
Gynecol Clin North Am.* 2002;29(4):817-42, viii.

60. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, et al: Human papillomavirus
DNS versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*
357(16):1579, 2007.

61. Mascarello, K. C.; Zandonade, E.; Amorim, M. H. Survival analysis of women
with cervical cancer treated at a referral hospital for oncology in Espírito
Santo State, Brazil, 2000-2005. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 4, p. 823-31,
Apr 2013. ISSN 1678-4464. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568311> >.

62. Massad, L. S.; Collins, Y. C.; Meyer, P. M. Biopsy correlates of abnormal
cervical cytology classified using the Bethesda system. **Gynecol Oncol**, v.
82, n. 3, p. 516-22, Sep 2001. ISSN 0090-8258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520149> >.

63. Mello IM. Colposcopia, In: Martins NV, Ribalta JC L, editores. *Patologia do
Trato Genital Inferior*. São Paulo: Roca; 491-539, 2005.

64. Mittal, D. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local
immune suppression in the skin expressing human papillomavirus
oncoprotein e7. *J Invest Dermatol*, v. 133, n. 12, p. 2686-94, Dec 2013. ISSN
1523-1747. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652797>

>.

65. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al: Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1085, 2002
66. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al: Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1093, 2002.
67. Murta EFC, Franca HG, Carneiro MC, Caetano MSSG, Adad SJ, Souza MAH. CH. C Carneiro MC, Caetano MSSG, UDIES OF CERVICAL CANCER. *Carcinoma of the cerv* *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1999;21(9):555-9.
68. Nakamura, T. et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci*, v. 98, n. 6, p. 874-81, Jun 2007. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433037> >.
69. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, et al.: Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* 132 (10): 810-9, 2000.
70. National Cancer Institute: Surveillance Epidemiology and End Results: SEER Stat Fact Sheets: cervix uterine 2011. Available at: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>. Accessed October 25, 2011.
71. Nunes JD, Vidal FC, Ferraro CT, Chein MB, Brito LM, Monteiro SC. Molecular detection of human papillomavirus in Brazilian women with cervical intraepithelial neoplasia in a northeast Brazilian city. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):9077-85.

72. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, et al: Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control* 14(9):805, 2003
73. Richart, R. M.; Wright, Jr.; T.C. Controversies in the management of low grade cervical Inthrepthelial neoplasia. *Cancer Sup*, 1993; 71 (4): 1413 – 1421
74. Robert S. Galen and S.Raymond Gambino. *Beyond Normality: Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses* (A Wiley biomedical publication) Hardcover – February 1, 1976
75. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, et al: Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 11:249, 2010.
76. Ronco, G. et al. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 11, p. 765-74, Jun 2006. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757701> >.
77. Roy, S. et al. Neem leaf glycoprotein overcomes indoleamine 2,3 dioxygenase mediated tolerance in dendritic cells by attenuating hyperactive regulatory T cells in cervical cancer stage IIIB patients. *Hum Immunol*, v. 74, n. 8, p. 1015-23, Aug 2013. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628394> >.

78. Sapp M, Bienkowska-Haba M: Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. FEBS J 276:7206, 2009
79. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, et al: American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Cancer J Clin 52(6):342, 2002
80. Sato, N. et al. Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. Oncol Rep, v. 28, n. 5, p. 1574-8, Nov 2012. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923135> >.
81. Schemper M 1993 The relative importance of prognostic factors in studies of survival. Stat Med 12:2377377723
82. Schemper M, Stare J 1996 Explained variation in survival analysis. Stat Med 15:1999 99 9
83. Sebastião APM; Noronha L; Carvalho NS; Collaço LM; Bleggi-Torres LF. Estudo das atipias indeterminadas em relação à prevalência e ao percentual de discordância nos casos do Programa de Prevenção do Câncer Uterino do Paraná. J Bras Patol Med Lab. 2004;40(6):431-8.
84. Sellors JW; Sankaranarayanan R. Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical. Manual para principiantes. Capítulo 2, 7 e 8. <http://screening.iarc.fr/colpo.php?lang=4>. (acessado em 27/01/2010)
85. Singh S, Johnson J, Chellappan S. Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. Biochim Biophys Acta. 2010;1799(10-12):788-94.

86. Sucher, R. et al. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the Pathogenesis of Malignant Tumor Disease. *Int J Tryptophan Res*, v. 3, p. 113-20, 2010. ISSN 1178-6469. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084593> >.
87. Takikawa, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3 dioxxygenase initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical Biophysical Research Commun*, v. 338, p. 12, 2005.
88. Thuler LCS, Bergmann A, Casado L. Perfil das Pacientes com Ces com C com C com Citora; 2011.ra; 2011.ed 12:2377377723 Prevenção do CRev Brasileira de Cancerologia 2012; 58(3):351-357.
89. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, et al: Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* 105:174, 2005
90. Upadhyay SK, Symonds RP, Haelterman M, et al: The treatment of stage IV carcinoma of cervix by radical dose radiotherapy. *Radiother Oncol* 11:15,1988
91. Tsoumpou, I. et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, v. 35, n. 3, p. 210-20, May 2009. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261387> >.
92. U.S. Department of Health and Human Services: The Health Consequences of smoking: a Report of the Surgeon General. Atlanta, GA, U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004, p 167

93. Vical Cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 98(11):765, 2006
94. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D *et al.* Protein p16 as a marker of dysplastic and neo- plastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. 2004; 4:58.
95. Walker P; Dexeus S; De Palo G; Barrasso R; Campion M; Girardi F *et al.* International Terminology of Colposcopy: An Updated Report from the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy: *Obstet Gynecol*. 101(1): 175–7, 2003.
96. Wang Qx, wang SZ, Liu J. Clinical significance on atypical cervical glandular cytology *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009; 89(39): 2779-82.
97. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, *et al.* Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1355Y60.
98. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004;64:3878-84.
99. Winer, R.L. *et al.* Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, v. 157, n. 3, p. 218-26, Feb 2003. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543621> >.

100. Wilkinson, E. J. Pap smears and screening for cervical neoplasia. **Clin Obstet Gynecol**, v. 33, n. 4, p. 817-25, Dec 1990. ISSN 0009-9201.
Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2289348> >.
101. World Health Organization ; ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Disponível em: < www.who.int/hpvcentre>. Acesso em: 20 jul. 2010. (Summary Report 2010).
102. World Health Organization (WHO). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>> (acessado em Abril 2014).
103. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008. Lyon: 2008. Acesso em: 10 set. 2010.
104. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 19/05/2014.
105. Yasmeen S, Romano PS, Pettinger M, et al: Incidence of cervical cytological abnormalities with aging in the Women's Health Initiative. **Obstet Gynecol** 108:410, 2006.
106. Zhao C et al. Clinical significance of atypical glandular cells in conventional pap smears in a large, high-risk U.S. west coast minority population. **Acta Cytol.** 2009; 53(2): 153-9.

9. Anexo I

FICHA DE COLETA DE DADOS

NOME

PRONTUÁRIO

NÚMERO DO FRASCO

CÓDIGO DE BARRAS DA BIÓPSIA

PARIDADE

IDADE

RAÇA/COR

PROCEDÊNCIA

TABAGISMO

SEXARCA

NÚMERO DE PARCEIROS

MÉTODO CONTRACEPTIVO

ESCOLARIDADE / PROFISSÃO

COMORBIDADES

MEDICAÇÕES DE USO CONTÍNUO

IMUNOSSUPRESSÃO

CIRURGIAS PRÉVIAS

DST
