

Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade

***ESCORE PROGNÓSTICO APÓS TRATAMENTO CIRÚRGICO DE  
NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO: PROPOSTA  
DE MODELO E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES PARA O SEGUIMENTO  
PÓS-OPERATÓRIO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim G. da Silva

Co-Orientador: Dr. José Humberto T. G. Fregnani

Barretos, SP

2013

Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade

***ESCORE PROGNÓSTICO APÓS TRATAMENTO CIRÚRGICO DE  
NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO: PROPOSTA  
DE MODELO E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES PARA O SEGUIMENTO  
PÓS-OPERATÓRIO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim G. da Silva

Co-Orientador: Dr. José Humberto T. G. Fregnani

Barretos, SP

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Marcos Davidson Muniz Fernandes

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

A553h Andrade, Carlos Eduardo Mattos da Cunha.

Escore prognóstico após tratamento cirúrgico de neoplasias intraepiteliais do colo uterino: proposta de modelo e possíveis implicações para o seguimento pós-operatório. / Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade. - Barretos, SP 2013.

54 f. : il.

Orientador: Dr. Ismael Dale Cotrim G. da Silva.

Co-orientador: Dr. José Humberto T. G. Fregnani.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade**

**HPV-16 como fator preditivo de recorrência para intraepiteliais do colo uterino tratadas cirurgicamente**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 26/08/2013

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Sergio Nicolau Mancini

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Instituição: Fundação Antonio Prudente – Hospital A. C. Camargo

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

Orientador

Prof. Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

Presidente da Banca Examinadora

## **SUORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número: 2011/19749-6).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

## **DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES**

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, baseando-se no regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos.

Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Dedicado este trabalho a minha família,  
em especial em memória do meu avô,  
que nos deixou durante a execução deste projeto,  
mas deixou um exemplo valioso como professor universitário,  
fazendo seu trabalho com excelência e dedicado aos que o seguiram.



## AGRADECIMENTOS

À minha amada esposa, pelo carinho e compreensão durante a execução deste projeto. Esta é a mais valorosa contribuição para que possa passar por todas as etapas exigidas durante este projeto.

Ao Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, pela confiança depositada em mim para executar esta pesquisa, certamente me motivou a sempre dar o máximo de minha capacidade. Agradeço a oportunidade de ter como orientador um dos principais nomes mundiais na área de minha pesquisa, que compartilhou seus conhecimentos valiosos de forma prática para execução da pesquisa.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho e Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pelas críticas precisas e valiosas na elaboração deste texto.

Ao Dr. José Humberto T. G. Fregnani, que aceitou a tarefa de ser meu co-orientador quando mais precisei de alguém para dar uma injeção de ânimo e de conhecimentos acadêmicos e científicos.

Ao meu pai, minha mãe, minha avó e meus irmãos, que pelo orgulho que sempre mostraram em minhas conquistas, me estimularam a começar este projeto e levá-lo até o final.

Aos amigos dos departamentos de Ginecologia Oncológica, Patologia, Pequenas Cirurgias, Biologia Molecular e Pós-graduação do HCB, que participaram de várias etapas deste projeto e sempre o fizeram com dedicação e responsabilidade, em especial ao Dr. Cristovam S. Neto e ao Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho que dedicaram seu tempo na imunohistoquímica usada neste projeto.

E às pacientes que aceitaram contribuir com esta pesquisa, por entenderem que participando poderiam contribuir para um melhor tratamento das mulheres que enfrentarão a mesma condição clínica no futuro.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia do câncer do colo uterino	1
1.2	Prevenção do câncer do colo uterino	3
1.3	Carcinogênese das lesões intraepiteliais do colo uterino	4
1.4	Recorrência das lesões intraepiteliais do colo uterino após tratamento cirúrgico	5
1.5	Recorrência: Fatores clínicos e anatomopatológicos	6
1.6	Recorrência: biomarcadores	7
1.7	Justificativa	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1	Desenho do estudo	12
3.2	População	12
3.2.1	Critérios de inclusão	12
3.2.2	Critérios de exclusão	12
3.3	Metodologia	12
3.3.1	Coleta e armazenamento da amostra citológica	12
3.3.2	Análise dos fatores preditivos de recorrência/persistência	13
3.3.3	Tratamento e seguimento	15
3.4	Análise estatística	15
3.5	Orçamento	17
3.6	Aspectos éticos	17
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>18</b>
4.1	Resultados	18

<b>4.2</b>	<b>Sobrevida livre de doença em 2 anos</b>	<b>18</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise multivariada</b>	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Modelos de escore prognósticos</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>33</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>

## **ANEXOS**

**Anexo A: Ficha de Coleta de Dados**

**Anexo B: Termo de Consentimento para Banco de Tumores**

**Anexo C: Comprovante de Submissão de Artigo**

**Anexo D: Carta de Aprovação do CEP**

## RESUMO

Andrade CEM. Escore prognóstico após tratamento cirúrgico de neoplasias intraepiteliais do colo uterino: proposta de modelo e possíveis implicações para o seguimento pós-operatório. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2013.

**INTRODUÇÃO:** Recorrência/persistência é um importante fator de manutenção do maior risco de progressão para câncer invasivo nas pacientes acometidas por neoplasia intraepitelial cervical (NIC) após tratamento cirúrgico. A criação de um escore prognóstico representa ferramenta valorosa na determinação do risco desta recorrência/persistência.

**OBJETIVO:** Avaliar fatores biomarcadores, clínicos e anatomopatológicos como preditores de recorrência/persistência após o tratamento cirúrgico das pacientes portadoras de NIC.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram incluídas as mulheres submetidas a tratamento cirúrgico por NIC entre Julho de 2009 e Fevereiro de 2011. Fatores clínicos, anatomopatológicos (da peça cirúrgica) e biomarcadores (detecção de HPV de alto risco na citologia pré-tratamento e imunexpressão de p16 na peça cirúrgica) foram avaliados por análise uni e multivariada para determinação dos fatores preditivos de recorrência em 2 anos. Após determinação das variáveis de interesse, foram elaborados modelos prognósticos de acordo com o coeficiente de regressão do modelo de Cox. **RESULTADOS:** Duzentas e quarenta e duas mulheres foram incluídas, com tempo mediano de seguimento de 23,6 meses. Houve 43 recorrências/persistências da doença após o tratamento. A sobrevida livre de doença em 2 anos foi 79,8% (IC95%: 74,3% - 85,3%). Na análise multivariada, os fatores de risco independentes para recorrência/persistência foram: tabagismo (HR=3,0; IC95%:1,6-5,6), margem cirúrgica positivas (HR=3,2; IC95%:1,6-6,1), presença do HPV-16 (HR=3,3; IC95%:1,6-6,9) e idade maior do que 45 anos (HR=2,7;IC95%:1,1-6,6). Para os quatro modelos prognósticos elaborados, não houve diferença estatística significativa entre as curvas ROC. **CONCLUSÃO:** A partir de informações clínicas (idade e consumo de tabaco), histopatológicas (margens cirúrgicas) e biomoleculares (status do HPV16 na citologia cervical pré-tratamento) foi possível elaborar um escore prognóstico capaz de predizer o risco de recorrência/persistência da NIC.

**PALAVRAS-CHAVES:** HPV, Neoplasia Intraepitelial Cervical, Tratamento, Recorrência, Persistência, Genotipagem, Biomarcadores, HPV-16, Modelos Prognósticos, Sobrevida.

## ABSTRACT

Andrade CEM. Prognostic scores after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia: a proposed model and possible implications for post-operative follow-up. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2013.

**BACKGROUND:** Recurrence / persistence is an important factor in maintaining the highest risk of progression to invasive cancer in patients affected by cervical intraepithelial neoplasia (CIN) after surgical treatment. The establishment of a prognostic score represents valuable tool in determining the risk of such recurrence / persistence. **OBJECTIVE:** To evaluate biomarkers, clinical factors and pathologic factors as predictors of recurrence / persistence after surgical treatment of patients with CIN. **MATERIALS AND METHODS:** We included women undergoing surgical treatment for CIN between July 2009 and February 2011. Clinical factors, pathological factors (surgical specimen) and biomarkers (high risk HPV detection in the pretreatment cytology and p16 imunoexpression in the surgical specimen) were evaluated by uni and multivariate analysis to determine the predictors of recurrence in 2 years. After determining the variables of interest, prognostic models have been developed in accordance with the regression coefficient of the Cox model. **RESULTS:** Two hundred and forty two women were included, with a median follow-up of 23.6 months. There were 43 recurrences / persistence of the disease after treatment. The disease-free survival at 2 years was 79.8% (95%CI: 74.3% - 85.3%). In multivariate analysis, independent risk factors for recurrence / persistence were: smoking (HR = 3.0, 95%CI :1.6-5.6), positive surgical margins (HR = 3.2;% C95: 1.6-6.1), the presence of HPV-16 (HR = 3.3, 95%CI :1.6-6.9) and age greater than 45 years (HR = 2.7, 95%CI: 1.1 -6.6). For the four prognostic models developed, there was no statistically significant difference between the ROC curves. **CONCLUSION:** From clinical (age and tobacco consumption), histopathological (surgical margins) and biomolecular (status of HPV16 in pretreatment cytology) information, it was possible to develop a prognostic score able to predict the risk of recurrence / persistence of CIN.

**KEYWORDS:** HPV, cervical intraepithelial neoplasia, Treatment, Recurrence, Persistence, Genotyping, Biomarkers, HPV-16, Model Predictions, Survival.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Câncer de colo uterino: Estimativa da taxa de incidência ajustada para idade por 100.000 mulheres. Globocan 2008 (IARC)	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	Câncer de colo uterino: Estimativa da taxa de mortalidade ajustada para idade por 100.000 mulheres. Globocan 2008 (IARC)	<b>2</b>
<b>Figura 3</b>	Fatores de progressão e regressão das lesões intra-epiteliais do colo uterino	<b>4</b>
<b>Figura 4</b>	Imunohistoquímica para P16(INK4A) na peça cirúrgica	<b>14</b>
<b>Figura 5</b>	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença em 2 anos	<b>25</b>
<b>Figura 6</b>	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença em 2 anos de acordo com o escore para os fatores de risco	<b>28</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Percentagem de regressão, persistência e progressão dos diferentes graus de NIC (Neoplasia Intraepitelial do Colo Uterino)	<b>5</b>
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos casos de acordo com as variáveis do estudo (n=242)	<b>19</b>
<b>Tabela 3</b>	Taxas de sobrevida livre de doença (2 anos) após a o tratamento cirúrgico de acordo com as variáveis do estudo	<b>21</b>
<b>Tabela 4</b>	Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico (modelo de Cox)	<b>22</b>
<b>Tabela 5</b>	Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico em mulheres cujas margens cirúrgicas foram negativas (modelo de Cox)	<b>22</b>
<b>Tabela 6</b>	Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico em mulheres cujas margens cirúrgicas foram positivas (modelo de Cox)	<b>23</b>
<b>Tabela 7</b>	Pontos atribuídos a cada uma das variáveis consideradas para a construção dos escores prognósticos de acordo com os respectivos coeficientes de regressão	<b>23</b>
<b>Tabela 8</b>	Taxas de sobrevida livre de doença em 2 anos e área under the curve (ROC curve) de acordo com os grupos de risco definidos pelos escores prognósticos	<b>24</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Epidemiologia do câncer do colo uterino**

O câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, excluindo o câncer de pele não-melanoma, com aproximadamente 530 mil casos novos no mundo, segundo a última estimativa realizada pela IARC em 2008. É responsável pelo óbito de aproximadamente 275 mil mulheres anualmente. Sua incidência é cerca de duas vezes maior nos países em desenvolvimento (Figura 1), onde ocorrem mais de 85% dos óbitos por este câncer<sup>1</sup>.

No Brasil o número de casos novos de câncer de colo uterino esperados para o ano de 2012 foi aproximadamente 18 mil, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de colo uterino é o mais incidente na região Norte. No Centro-Oeste e no Nordeste ocupa a segunda posição, na região Sudeste a terceira posição e na Sul a quarta posição<sup>2</sup>.

Em países desenvolvidos, a sobrevida média em 5 anos varia de 51% a 66%. Nos países em desenvolvimento, os casos são encontrados em estádios mais avançados e, conseqüentemente, a sobrevida é menor, cerca de 41% em 5 anos (Figura 2). A estimativa da média mundial é de 49% em 5 anos<sup>3</sup>.

Por serem as lesões intraepiteliais e o câncer do colo uterino causados por certos tipos de Papilomavírus Humano (HPV) considerados oncogênicos ou de alto risco, e a forma de transmissão destes vírus ser por via sexual<sup>4</sup>, a maior incidência destas doenças são em mulheres jovens.

O risco das mulheres que apresentaram atividade sexual ao longo de suas vidas contraírem o vírus HPV é de 50 – 80%. Estudos transversais mostraram uma prevalência de positividade para HPV DNA de 10,2% entre mulheres com exame citológico normal no mundo, chegando até 22,9% no continente africano<sup>5,6</sup>. O pico de incidência para infecções por HPV ocorre em torno dos 25 anos, e progressivamente reduz dos 30 aos 45 anos, para novamente apresentarem um novo pico de incidência na perimenopausa<sup>7</sup>.



■ < 7.0   ■ < 12.9   ■ < 20.2   ■ < 29.6   ■ < 56.3

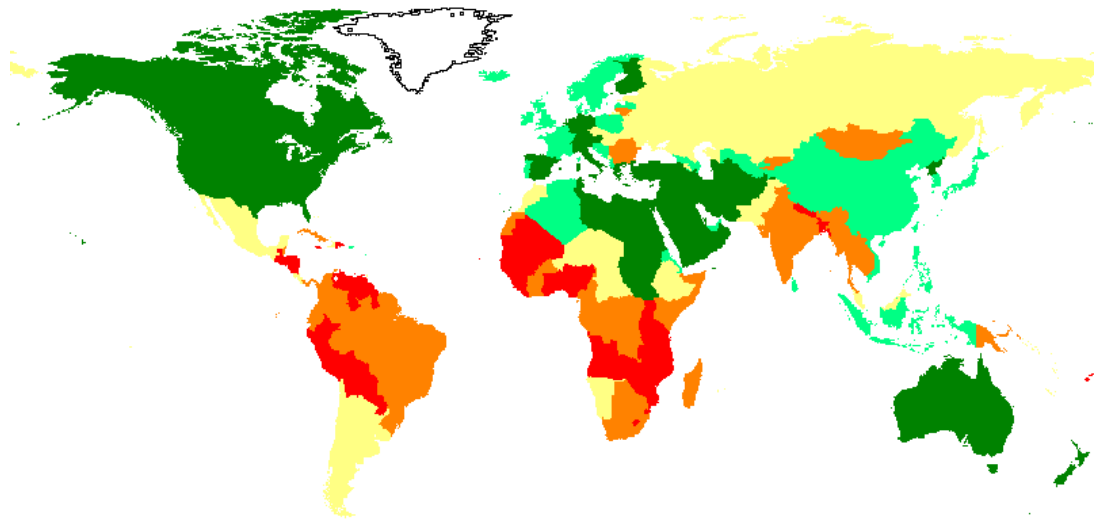


Figura 1. Câncer de colo uterino: Estimativa da taxa de incidência ajustada para idade por 100.000 mulheres. Fonte: Globocan 2008 (IARC)<sup>1</sup>

■ < 2.7   ■ < 5.9   ■ < 10.1   ■ < 17.6   ■ < 41.7

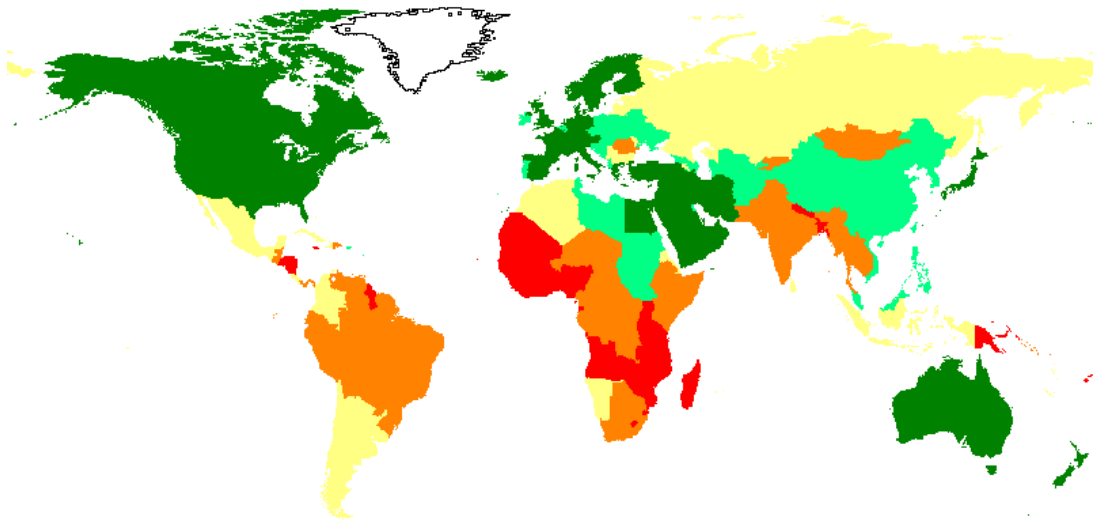


Figura 2. Câncer de colo uterino: Estimativa da taxa de mortalidade ajustada para idade por 100.000 mulheres. Fonte: Globocan 2008 (IARC)<sup>1</sup>

## 1.2. Prevenção do câncer do colo uterino

O câncer do colo uterino é uma neoplasia maligna prevenível, tanto por meio da vacinação (prevenção primária), quanto pelo rastreamento (prevenção secundária) e tratamento de suas lesões precursoras (prevenção terciária). A aquisição de amplo conhecimento sobre a biologia do HPV, e como o material genético (DNA HPV) dos HPVs de alto risco se integra ao das células do colo uterino, e causa um processo de transformação celular até a progressão ao câncer forneceu subsídios biológicos para a estruturação de todas as etapas de prevenção<sup>8,9</sup>.

Até a década de 90, o exame colpocitológico convencional (ou exame de Papanicolaou) era a principal estratégia de prevenção do câncer do colo uterino, e devido ao emprego do rastreamento de lesões precursoras, a incidência e mortalidade do câncer do colo uterino caíram drasticamente nos países que o adotaram de forma sistemática. No Brasil, é recomendado prioritariamente para mulheres de 25 a 64 anos. Porém hoje, conta-se com métodos de rastreamento mais eficientes, como o teste para detecção e/ou genotipagem do DNA HPV, a expressão de oncoproteínas E6/E7 e a imunexpressão de p16<sup>10,11</sup>. Estes testes servem como marcadores de processos biológicos patológicos através da detecção de moléculas ou características biológicas específicas para cada teste. Estes métodos podem, em teoria, reduzir a ainda alta mortalidade do câncer do colo uterino. Oferecem tratamento mais apropriado às lesões precursoras do colo uterino, baseado no fato de poderem discriminar melhor a presença destas lesões intraepiteliais (LIE). Como também diferenciá-las mais precisamente entre lesões de baixo grau ou de alto grau. E ainda podem prever com maior exatidão quais lesões apresentam um risco maior para persistência, transformação, progressão ou regressão<sup>12-14</sup>.

As vacinas para HPV são seguras, imunogênicas e efetivas na prevenção de infecções pelos principais tipos de HPV de alto risco, o HPV 16 e o HPV 18, e por conseguinte das LIE do colo uterino que estes vírus causariam. Mesmo com a proteção cruzada para alguns outros tipos de HPV, não serão capazes de erradicar o câncer cervical. Deve-se aguardar ainda se as respostas imunológicas induzidas pela vacina serão prolongadas ao ponto de proteger as mulheres durante o período em que estão mais expostas a contrair o vírus do HPV. E ainda o papel dos outros tipos virais que não obtêm resposta cruzada pela vacinação<sup>12</sup>.

Contudo, o emprego das vacinas foi outro importante avanço na prevenção do câncer do colo uterino, e deverá trazer mudanças no futuro para os programas de rastreamento das lesões precursoras<sup>15</sup>.

### 1.3. Carcinogênese das lesões intraepiteliais do colo uterino:

Na carcinogênese do câncer do colo do útero, a persistência da infecção por um tipo de HPV de alto risco é etapa crucial. Para esta persistência, tanto fatores relacionados ao tipo de HPV como fatores relacionados à hospedeira são importantes (Figura 3), porém não completamente entendidos.

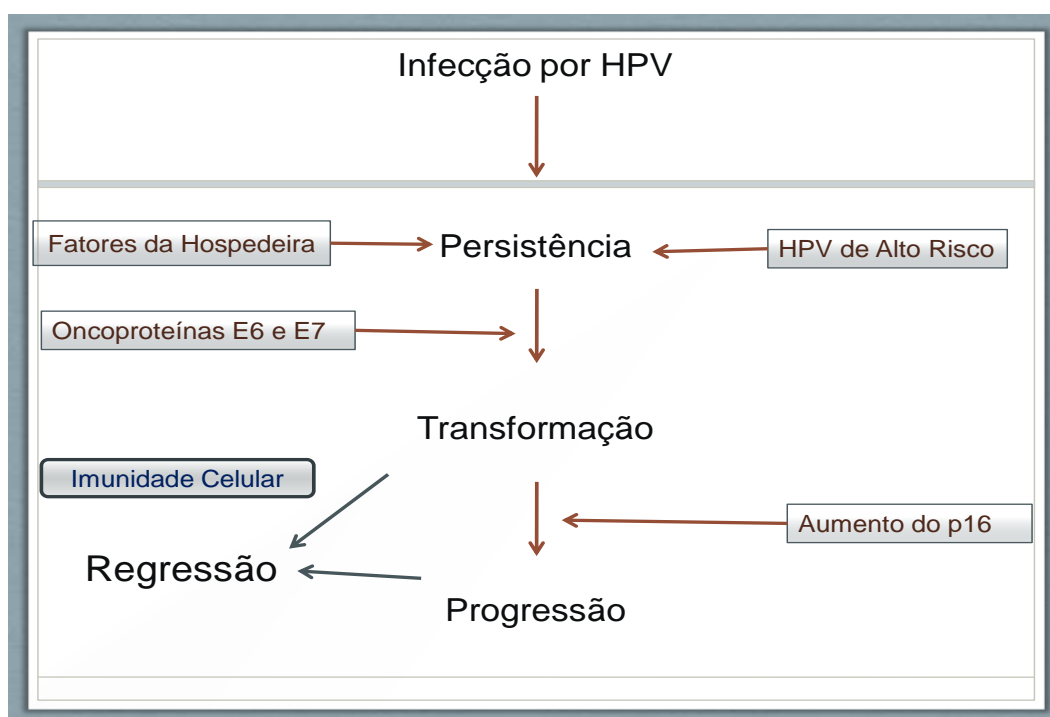


Figura 3. Fatores de progressão e regressão das lesões intra-epiteliais do colo uterino.

Após a infecção por um HPV de alto risco, além da persistência, pode ocorrer o clareamento deste vírus, fenômeno conhecido por infecção transiente. Este tipo de infecção traz problema adicional ao rastreamento das lesões precursoras. Casos com teste positivo para HPV mas com citologia normal, tanto podem ser devido a menor sensibilidade do exame citológico (falso negativo) como também devido à infecção transiente<sup>7</sup>.

A identificação de oncoproteínas E6/E7 derivadas de HPV de alto risco, ou do acúmulo de p16 no interior das células escamosas do colo uterino, pode mostrar as lesões em progressão, que necessitam de diagnóstico e tratamento adequados<sup>11,16</sup>.

Na prática clínica o estudo destes fatores serviria à identificação das lesões intraepiteliais que sofreriam regressão espontânea, que ocorre tanto em lesões de baixo quanto as de alto grau (Tabela 1)<sup>17</sup>, pouparia mulheres jovens de serem submetidas a ressecções desnecessárias do colo uterino (conização), e com potencial significativo de insuficiência cervical e necessidade de cerclagem durante a gravidez<sup>18</sup>.

Tabela 1. Percentagem de regressão, persistência e progressão dos diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical.

NIC	Regressão	Persistência	Progressão para Carcinoma in situ	Progressão para Carcinoma invasivo
NIC 1	57%	32%	11%	1%
NIC 2	44%	35%	22%	5%
NIC 3	32%	<56%	-	12%

Fonte: Ostor, AG.<sup>17</sup>

Por outro lado, identificando as lesões que apresentam alto risco de progressão para carcinoma invasivo, o tratamento cirúrgico poderia ser individualizado, buscando uma ressecção mais ampla para a obtenção de margens negativas, e após o seguimento oncológico adequado.

A despeito do tratamento realizado seguindo as recomendações de sociedades especializadas, pacientes acometidas por HPV de alto risco apresentam um risco 4 a 5 vezes maior de desenvolver um carcinoma invasivo em relação a população geral<sup>19,20</sup>. No Reino Unido, um estudo de 2005 mostrou que cerca de 16% das mulheres diagnosticadas com câncer cervical, tinham sido tratadas previamente para LIE<sup>19</sup>.

#### 1.4. Recorrência das lesões intraepiteliais do colo uterino após tratamento cirúrgico

O principal fator para a manutenção do risco elevado de progressão das LIE até o câncer após o tratamento cirúrgico é a recorrência da doença<sup>21</sup>. Esta recorrência ocorre ou

por uma persistência de LIE após o tratamento ou pela manutenção da infecção de HPV oncogênico. Como o momento da identificação da recorrência da lesão intraepitelial depende da sensibilidade dos exames de seguimento, e na rotina este seguimento ocorre entre quatro a seis meses após o tratamento cirúrgico, a diferenciação entre persistência e recorrência da lesão intraepitelial é difícil de conceituar. E esta diferenciação não tem nenhum impacto no seu tratamento.

A recorrência de lesões precursoras após o tratamento varia muito na literatura, com frequência de 5,3% a 53%<sup>22-24</sup>. Esta variação se deve muito a falta de padronização nos critérios utilizados para a definição de recorrência (citopatológicos ou histopatológicos).

Vários estudos mostraram que a técnica cirúrgica (conização com alça de alta frequência ou cone a frio) não interfere no risco de doença residual após o tratamento<sup>25-27</sup>.

O que se tem utilizado com maior frequência como fator de risco para recorrência é o status das margens cirúrgicas da conização, a idade da paciente, o tabagismo e a presença de extensão glandular da LIE<sup>22-24,28-33</sup>. Porém todos estes fatores se mostraram insuficientes em prever com precisão quais mulheres recorrerem após a conização.

### **1.5. Recorrência: Fatores clínicos e anatomopatológicos**

Determinar as pacientes com maior risco de recorrência após o tratamento cirúrgico das LIE é fundamental para programar o adequado seguimento pós-operatório ou a necessidade de complementação do tratamento<sup>28</sup>. Para alguns grupos, estes fatores já são suficientes para determinar a complementação do tratamento com histerectomia após a conização<sup>29</sup>, porém outros grupos demonstram que utilizar fatores como margens cirúrgicas, idade, grau da lesão ou tabagismo para definir a complementação cirúrgica podem trazer uma morbidade maior, sem uma seleção adequada dos pacientes em risco<sup>30</sup>.

A idade acima dos 50 anos pode apresentar como fator de risco para recorrência. Estudo conduzido por Tyler e cols mostrou que mulheres com idade acima dos 50 anos tinham 5 vezes mais chances de lesão de alto grau residual, quando comparadas com mulheres abaixo dos 30 anos, após tratamento cirúrgico.<sup>23</sup>

O comprometimento das margens cirúrgicas é o fator de risco mais estudado no tratamento das LIE, e é o principal fator anatomopatológico envolvido com a recorrência<sup>23,24,29,31</sup>. Porém outros estudos demonstraram que fatores clínicos e anatomopatológicos não são critérios prognósticos adequados para recorrência<sup>22,32</sup>. Costa e cols. identificaram que a prevalência de persistência de doença nas pacientes com margens

cirúrgicas do cone negativas foi 5,3%, e a frequência observada entre os casos com margens comprometidas de 5,9%. Estes resultados, contudo, não confirmam os dados da maioria dos estudos previamente publicados<sup>22</sup>.

#### **1.6. Recorrência: Biomarcadores**

Os fatores clínicos e anatomopatológicos podem desempenhar um importante papel na determinação da recorrência, mas não devem ser os únicos fatores a serem avaliados. Outros fatores devem ser levados em consideração como a detecção do DNA HPV, a genotipagem, a detecção das oncoproteínas E6/E7 e a detecção de p16 por imunohistoquímica, os quais têm sido amplamente empregados no rastreamento e definição diagnóstica das LIE. Porém sua utilização como fatores prognósticos ainda foi pouco estudada, e ainda não é possível determinar a sua utilidade clínica para prever a recorrência<sup>33</sup>.

Os testes para detecção do DNA HPV foram introduzidos na prática clínica há aproximadamente 15 anos. Estes testes amplificam e detectam a presença de DNA dos HPVs de alto risco em amostras de citologia cervical. Os genótipos de HPV que o teste pode identificar varia de acordo com o fabricante, e alguns testes são capazes, além de identificar a presença do DNA HPV, discriminar certos genótipos de mais alto risco, como o HPV 16 e o HPV 18<sup>34</sup>.

Ensaio clínico, utilizando um grande número de casos já demonstraram que os testes para detecção do DNA HPV de alto risco tem sensibilidade superior à citologia cervical na detecção de lesões de alto grau ou câncer do colo uterino. O seu uso como ferramenta auxiliar no rastreamento de câncer do colo uterino já é recomendado pelas sociedades especializadas<sup>8,15,35,36</sup>.

Como a infecção persistente pelo HPV de alto risco tem papel fundamental na progressão da LIE, a identificação dos mesmos evidenciam as lesões realmente em risco de desenvolver um câncer invasivo.

Estudo feito por Leguevaque e cols. demonstrou que a identificação de HPV de alto risco antes do tratamento das LIE é um fator preditivo de recorrência<sup>37</sup>. Mas outros estudos utilizando o teste de Captura Híbrida 2<sup>®</sup> só demonstraram significância estatística para recorrência quando a presença de HPV de alto risco ocorria com altas cargas virais<sup>38-42</sup>. A explicação é que exames com baixa carga viral podem representar uma infecção transiente, que apresenta um baixo risco de persistência. Exames com alta carga viral têm maior chance

de representar uma infecção persistente, o que aumenta o risco de progressão de uma LIE do colo uterino para câncer<sup>35</sup>.

Genótipos diferentes de HPV diferem em sua capacidade de induzir a carcinogênese no colo uterino. E o reconhecimento dos genótipos de HPV envolvidos nas LIE, através da genotipagem, pode ser uma forma mais apropriada de identificar as pacientes com maior risco para presença de LIE de alto grau, ou de lesões persistentes<sup>8</sup>.

Os genótipos de HPV mais relacionados ao câncer do colo uterino são o HPV 16 e o HPV 18. São responsáveis por cerca de 75% dos casos em progressão. Estudo observacional demonstrou que lesões causadas pelos HPVs 16/18 podem apresentar progressão mais rápida em relação às lesões causadas por outros tipos de HPV de alto risco<sup>43</sup>.

Estudos prévios demonstram que as pacientes infectadas pelos HPVs 16/18<sup>38</sup>, e sobretudo pelo HPV 16<sup>39,44</sup>, antes do tratamento cirúrgico, tiveram maior risco de recorrência/persistência das lesões durante o seguimento. Isto seria explicado por uma menor taxa de clareamento da infecção que estes genótipos de HPV exibem<sup>44</sup>.

A imunohistoquímica para p16(INK4a) é uma valiosa ferramenta para identificação de lesões intra-epiteliais de alto grau do colo uterino causadas por tipos de HPV de alto risco, produtores das oncoproteínas E6/E7<sup>45-49</sup>. A proteína p16 é o produto do gene INK4a, tem como função celular a supressão tumoral, por desacelerar o ciclo celular, através da inibição de quinases dependentes de ciclina-4/6 (CDK-4/6), que fosforilam a proteína do Retinoblastoma (pRb) e promovem a passagem do ciclo celular da fase G1 para S<sup>50,51</sup>.

A infecção persistente por HPV de alto risco leva a integração do DNA-HPV ao genoma humano e, assim, à produção das oncoproteínas E6 e E7. A oncoproteína E7 tem como ação a degradação da pRb. Como esta proteína regula a produção da p16 por uma alça de retroalimentação negativa, a degradação da pRb resulta em acúmulo da proteína p16 no núcleo e no citoplasma das lesões intra-epiteliais em progressão<sup>45,50,51</sup>. Este acúmulo de p16 pode ser identificado por imunohistoquímica.

A imunohistoquímica para p16 já foi relacionada com o grau da lesão intraepitelial<sup>46,52</sup>, e com um maior risco de progressão das lesões de baixo grau ou das pacientes com teste de HPV-DNA positivo e citologia cervical negativa<sup>53</sup>. É possível ainda que a imunohistoquímica para p16 tenha um papel como biomarcador de resposta ao tratamento, por refletir lesões em progressão<sup>46,54</sup>.

Contudo, estudo conduzido por Branca e cols não demonstrou que a expressão da p16 tenha valor prognóstico para prever o clareamento do HPV de alto risco após o tratamento de lesão intra-epitelial do colo uterino<sup>52</sup>.

Testes para detecção do RNAm das proteínas E6/E7 de HPV de alto risco tem como alvo os produtos da transcrição dos genes E6 e E7 de subtipos selecionados de HPV de alto risco. Estes produtos, as oncoproteínas E6 e E7, são responsáveis pela instabilidade genômica e distinção do processo de transformação celular de uma infecção viral latente<sup>55</sup>.

A ação da oncoproteína E6 é a degradação da proteína humana p53, e a E7 atua interferindo na ação da proteína pRb. Atuando sobre as proteínas humanas, as oncoproteínas E6 e E7 reativam a síntese de DNA celular quando o ciclo celular deveria entrar na fase de repouso, atuam inibindo a apoptose, e retardam a diferenciação dos queratinócitos infectados, criando um ambiente permissivo à replicação do DNA viral<sup>7,55</sup>.

Detectar os RNAm transcritos pelos genes E6/E7 possibilita diferenciar infecções transientes das persistentes, as quais levam ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais com alto risco de progressão. Em comparação com os testes de detecção de DNA-HPV, os testes de detecção de RNAm E6/E7 são mais precisos em prever lesões que progredirão até o câncer invasivo<sup>8</sup>. Estudos que avaliaram a aplicação deste teste no rastreamento de lesão intraepitelial, mostraram que apesar de sua melhor especificidade em diferenciar as lesões de mais alto grau, a sua sensibilidade em detectar a presença de lesões é inferior quando comparados aos testes de detecção de DNA-HPV<sup>16,56-59</sup>. Conclui-se que os testes para detecção de RNAm E6/E7 não deve ser aplicado para o rastreamento, porém podem ser aplicados para situações em que se queira poupar pacientes de tratamento cirúrgico, por avaliar se lesões de alto grau estão em progressão ou regressão<sup>16,60</sup>.

Ainda não está estabelecido se o teste para detecção de RNAm E6/E7 é um fator prognóstico para recorrência de lesão intra-epitelial após tratamento cirúrgico. Estudo conduzido por Sarkar e cols identificou uma associação significativa entre uma resposta imune celular específica para as oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 e uma sobrevida livre de recorrência em pacientes tratadas por NIC<sup>61</sup>. Mas a avaliação da presença do RNAm para E6/E7 como fator prognóstico não foi estudado.

## **1.7 Justificativa**

Este estudo procura ampliar a utilização de fatores preditivos de recorrência para lesões intraepiteliais do colo uterino tratadas cirurgicamente. E tem como diferencial a



avaliação de fatores pré-operatórios e de fatores presentes na peça cirúrgica. E a partir da análise destes fatores criar um novo escore prognóstico, capaz de discriminar as pacientes em maior risco de recorrência, que necessitam de um seguimento intensivo após o tratamento cirúrgico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a presença dos genótipos HPV 16 e HPV 18, a expressão de biomarcadores moleculares (imunohistoquímica para p16INK4a) e a recorrência/persistência de alterações citoarquiteturais induzidas pelo HPV após o tratamento cirúrgico das pacientes acometidas por neoplasias intraepiteliais do colo uterino.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a sobrevida livre de doença (recorrência / persistência) em 2 anos de acordo com as variáveis clinico-demográficas, histopatológicas, imunoexpressão de p16INK4a e detecção de HPV de alto risco (HPV 16, HPV 18 e outros)
- Determinar os fatores de risco independente para recorrência / persistência de doença (em 2 anos de seguimento)
- Propor um escore capaz de prever a sobrevida livre de doença (recorrência ou persistência) em 2 anos de seguimento.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo observacional longitudinal, com coleta ambispectiva dos dados.

#### **3.2. População**

Foram incluídas no estudo as mulheres admitidas no Departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), submetidas a tratamento cirúrgico conservador para neoplasias intraepiteliais do colo uterino entre 1º de Julho de 2009 a 28 de Fevereiro de 2011. Os seguintes critérios de elegibilidade foram adotados.

##### **3.2.1. Critérios de Inclusão**

- Mulheres com 18 anos ou mais.
- Aceitação em participar do estudo, manifesta por meio de assinatura do Termo de Consentimento para Banco de Tumores.
- Pacientes com indicação de tratamento cirúrgico (conização a frio ou com alça diatérmica de alta frequência ou exérese da zona de transformação) para uma das seguintes situações: neoplasias intraepiteliais de alto grau, discordância entre citologia e histologia, colposcopia insatisfatória, neoplasia intra-epiteliais de baixo grau persistentes.
- Seguimento ambulatorial da paciente pelo Departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos.

##### **3.2.2. Critérios de exclusão**

- Pacientes com diagnóstico de carcinoma invasor na peça cirúrgica.
- Material citológico insuficiente para realização do teste COBAS para detecção de HPV®.

#### **3.3. Metodologia**

##### **3.3.1. Coleta e armazenamento da amostra citológica**

As amostras citológicas para realização dos testes biomoleculares foram coletadas por escovado endocervical imediatamente antes da realização do tratamento cirúrgico e

armazenadas em solução conservadora à base de metanol, e armazenadas no Banco de Tumores do HCB. Após inclusão do caso no estudo, o material foi centrifugado, desprezando-se o excesso de fixador líquido, e ressuspensão em 200 µL de água livre, RNase e DNase, sendo 100 µL destinados a extração de RNA e armazenado a -80°C, e 100 µL para extração de DNA e armazenado a -20°C.

### **3.3.2. Análise dos fatores preditivos de recorrência/persistência**

Foram analisados neste estudo as seguintes variáveis: clínico-demográficas (idade, consumo de tabaco, paridade, idade de início da atividade sexual, uso de contraceptivo oral, sorologia positiva para HIV e gestação prévia), anatomopatológicas (exame histopatológico da biópsia do colo uterino antes da cirurgia, exame histopatológico da peça cirúrgica, status da margem cirúrgica e presença de extensão glandular) e biomoleculares (resultados do teste COBAS para detecção de HPV® e imunexpressão para proteína p16(INK4A)).

Os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes foram coletados retrospectivamente através da ficha de coleta de dados (Anexo A).

As amostras citológicas da população em estudo foram utilizadas para a extração do RNA e DNA conforme metodologia descrita anteriormente. As alíquotas de DNA foram utilizadas para a detecção e genotipagem de HPV através do instrumento COBAS para detecção de HPV®(Roche Molecular System, CA, EUA), seguindo protocolo determinado pelo fabricante. Este teste detecta 14 genótipos de HPV de alto risco, com demonstração de 3 resultados distintos: presença do HPV-16, do HPV-18 e outros 12HPVs de alto risco (31, 33, 35, 39, 54, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

Foi realizada nas peças cirúrgicas a análise imunohistoquímica para proteína p16(INK4A), com utilização do Kit CINtec®Histology (clone E6H4™, Roche mtm Laboratories, EUA). O processo de imunorreação seguiu estritamente as orientações do fabricante. As análises de imunexpressão para p16 foram realizadas por um dos dois pesquisadores envolvidos neste estudo (Scapulatempo-Neto C, Longatto-Filho A). Para fins deste estudo, considerou-se a imunexpressão citoplasmática positiva para p16 a presença de marcação moderada ou forte em mais de 75% da neoplasia intraepitelial (Figura 4). Em relação à expressão nuclear, a presença de qualquer marcação do anticorpo no núcleo foi considerada positiva, independentemente da intensidade e extensão.

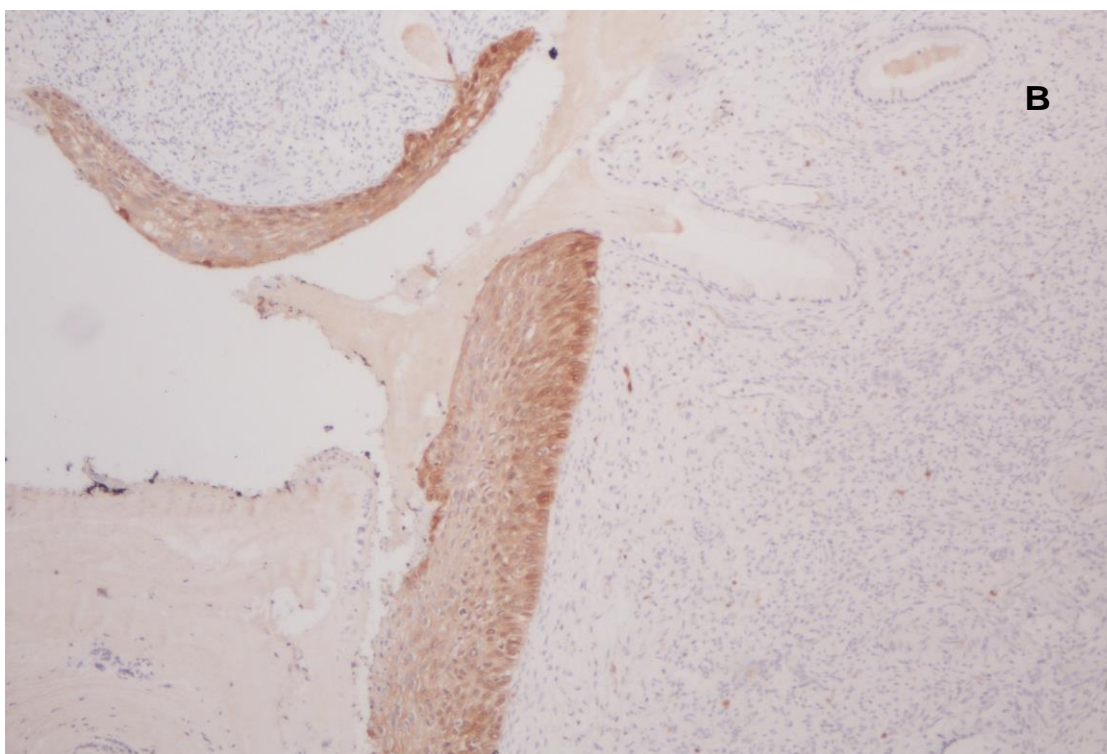
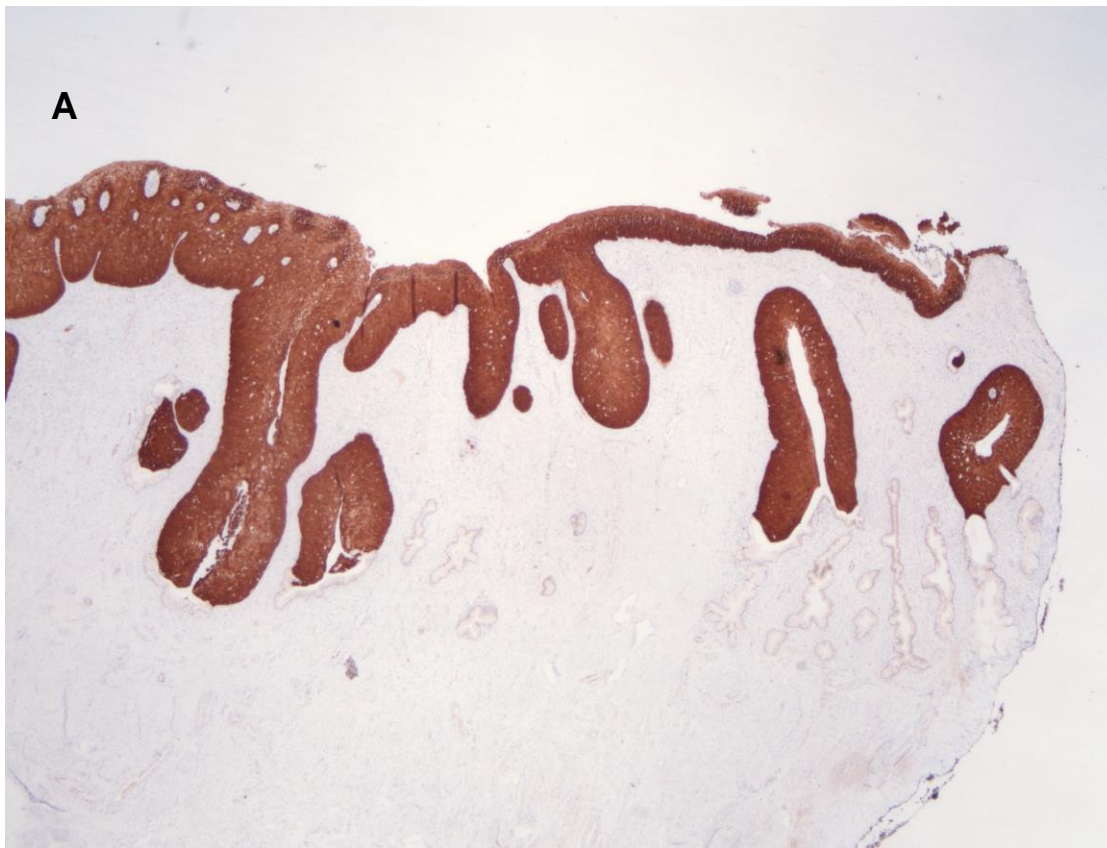


Figura 4. Imunohistoquímica para P16(INK4A) na peça cirúrgica. Quadro A mostra lesão de alto grau com imunoexpressão positiva (aumento 20X). Quadro B mostra lesão de baixo grau com imunoexpressão negativa (aumento 100X).

### **3.3.3. Tratamento e seguimento**

As indicações de cirurgia e o seguimento das pacientes após o tratamento cirúrgico conservador para LIE de alto grau seguiram os protocolos já estabelecidos pelo departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos. O médico assistente responsável pelo caso pode escolher a seu critério clínico a técnica cirúrgica para o tratamento da NIC (cone frio, conização com alça de alta frequência ou exérese da zona de transformação). As cirurgias foram realizadas tanto pelo médico assistente quanto pelos médicos residentes da instituição, sempre assistidos pelo médico assistente.

De acordo com o protocolo da instituição, após a cirurgia, as pacientes foram examinadas e realizaram citologia cervical semestralmente por dois anos. Caso as margens cirúrgicas fossem positivas, no primeiro ano o acompanhamento aconteceu a cada 4 meses. Aquelas mulheres que apresentassem alteração na citologia (equivalente a ASCH ou pior) foram referenciadas para colposcopia, realizando-se biópsia se necessário. Após dois anos de seguimento, as pacientes foram contra-referenciadas para o sistema primário de saúde a fim de manter o seguimento conforme protocolo do Ministério da Saúde.

Para o estudo, considerou-se recorrência os casos que durante os dois anos de seguimento apresentaram as seguintes alterações no exame citopatológico: lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG), lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG) ou carcinoma invasor. Também se considerou recorrência os casos que durante o seguimento apresentarem biópsia do colo uterino evidenciando NIC 1, NIC 2, NIC 3/ carcinoma *in situ*, adenocarcinoma *in situ* ou carcinoma invasor. E para análise estatística, não foi diferenciada recorrência de persistência.

### **3.4. Análise estatística**

A casuística foi caracterizada por meio da estatística descritiva. Os testes de qui-quadrado, exato de Fischer ou teste t de Student foram utilizados para a comparação de grupos de acordo com as variáveis de interesse.

As probabilidades de sobrevida livre de doença (recorrência/persistência de doença) em dois anos, contados desde da realização do tratamento cirúrgico até o momento da recorrência ou até completar 24 meses, foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier para cada variável do estudo. As diferenças entre as curvas foram avaliadas por meio do teste de log rank.

A análise multivariada exploratória para determinação dos fatores preditivos de alterações citoarquiteturais induzidas pelo HPV após o tratamento cirúrgico de neoplasias intraepiteliais do colo uterino foi realizada pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Foram selecionadas para o modelo todas as variáveis que na análise univariada tiveram valor de P de até 0,10.

As variáveis identificadas no modelo multivariado foram utilizadas para a elaboração dos escores prognósticos. Para cada caso calcularam-se 4 possíveis modelos de escores prognósticos. O primeiro modelo de escore (A) não foi ponderado e, de acordo com o coeficiente de regressão no modelo de Cox, atribuindo-se apenas os valores 0 ou 1, respectivamente na ausência ou presença do fator de risco. Nos outros três modelos de escore (B, C e D), os pontos foram atribuídos de acordo com os valores dos coeficientes de regressão obtidos no modelo de Cox para cada variável. Para a atribuição dos pontos ponderados, calculou-se inicialmente a amplitude dos coeficientes de regressão (diferença entre o maior e o menor valor). Esta amplitude foi dividida em 3 partes iguais no escore B, 4 partes no escore C e 5 partes no escore D. Para o escore B, foram atribuídos pontos que variaram de 0 (ausência do fator de risco) até 3. Atribuiu-se 1 ponto às variáveis com valor do coeficiente de regressão compreendido no primeiro terço da amplitude, 2 pontos no segundo terço e três pontos no último terço. Para o escore C atribuíram-se pontos que variaram de 0 a 4 e o escore D de 0 a 5 de acordo com os valores dos coeficientes de regressão. Os valores atribuídos em cada escore foram somados, chegando-se ao valor total.

A definição dos grupos de risco para recorrência/persistência da doença em cada escore baseou-se nas taxas de sobrevida livre de doença em 2 anos. Os valores de escores com taxas de sobrevida igual a 100% foram classificados como de muito baixo risco, 80-99% como de baixo risco, 60-79% como de risco intermediário e inferior a 60% como alto risco. Estes escores categorizados em 4 grupos foram analisados através da curva ROC, considerando-se o fator discriminante a recorrência/persistência da doença em 2 anos. As áreas sob a curva ROC foram comparadas com o intuito de se avaliar o modelo de escore que melhor pudesse prever o desfecho do estudo.

O nível de significância foi de 5% para todos os testes estatísticos. As análises foram realizadas através dos programas SPSS v20.0 e MedCalc v11.

### **3.5. Orçamento**

Para o financiamento do projeto, foi obtido fomento junto a FAPESP (processo nº2011/19749-6) que incluiu todas as despesas com material de consumo. Os demais gastos eventuais ficaram a cargo do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII.

### **3.6. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos (Nº 330/2010) e submetido ao cadastro no SISNEP.

Para esclarecimento e obtenção de consentimento das pacientes envolvidas neste estudo utilizou-se o “Termo de Informação e Consentimento do Banco de Tumores”, o qual era utilizado na época da inclusão das pacientes no estudo (Anexo B).

O tratamento adotado e o seguimento das pacientes após o tratamento não foram alterados em relação aos protocolos de conduta estabelecidos pelo departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos. Todo o material extraído para pesquisa foi oriundo do Banco de Tumores desta Instituição, colhido durante o tratamento e o seguimento das pacientes.



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Descrição da casuística**

A tabela 2 traz a caracterização das 242 mulheres elegíveis para o estudo, bem como o status do HPV 16 e 18 e os resultados de imunoeexpressão do p16INK4A. O tempo mediano de seguimento foi 23,6 meses (variando de 0 a 37,8 meses). Duas pacientes não retornaram para o seguimento pós-operatório. Durante o período do estudo 43 mulheres apresentaram recorrência/persistência da doença após o tratamento (17,8%; IC95%: 12,9% - 23,9%). A sobrevida livre de doença em 2 anos de todas as mulheres incluídas foi de 79,8% (IC95%: 74,3% - 85,3%). O tempo mediano para recorrência/persistência da doença foi de 11,2 meses (variação: 2,7 a 29,7 meses).

### **4.2. Sobrevida livre de doença (em 2 anos)**

A tabela 3 mostra as probabilidades de sobrevida livre de doença em 2 anos de acordo com as variáveis do estudo. As variáveis que se associaram com o desfecho foram: idade >45 anos ( $p=0,033$ ), consumo de tabaco ( $p<0,001$ ), diagnóstico histopatológico na biópsia de lesão de baixo grau ( $p=0,008$ ), margens cirúrgicas comprometidas ( $<0,001$ ), presença de HPV de alto risco ( $p=0,021$ ), presença de HPV-16 ( $p<0,001$ ) e imunoeexpressão positiva de p16 no citoplasma ( $p=0,049$ ).

### **4.3. Análise multivariada**

De acordo com o modelo de Cox, os fatores de risco independentes para recorrência/persistência de doença foram: tabagismo (HR=3,0; IC95%:1,6-5,6), margens cirúrgica positivas (HR=3,2; IC95%:1,6-6,1), presença do HPV-16 (HR=3,3; IC95%:1,6-6,9) e idade maior do que 45 anos (HR=2,7;IC95%:1,1-6,6) (tabela 4).

As análises multivariadas também foram feitas de forma estratificada de acordo com o status das margens cirúrgicas. Tais análises podem ser vistas nas tabelas 5 e 6.

### **4.4. Modelos de Escore Prognósticos**

A tabela 7 traz as variáveis consideradas para a construção dos quatro modelos de escore prognóstico e os respectivos pontos atribuídos de acordo com os valores dos coeficientes de regressão obtidos no modelo de Cox. A tabela 8 mostra as taxas de sobrevida livre de doença em 2 anos de acordo com os grupos de risco definidos pelos

escores. Na análise da curva ROC, as áreas sob a curva para os escores A, B, C e D foram respectivamente 0.783, 0.791, 0.781 e 0.781, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas. A figura 5 demonstra as curvas de Kaplan Meier de acordo com os grupos de risco definidos pelo escore A.

Tabela 2 - Distribuição dos casos de acordo com as variáveis do estudo (n=242).

VARIÁVEL	CATEGORIAS	N	%
Idade	Até 30 anos	61	25,2
	31 – 45 anos	115	47,5
	> 45 anos	66	27,3
Idade de início da atividade sexual	< 16 anos	90	37,2
	16 anos ou mais	121	50,0
	Ignorado	31	12,8
Paridade	Nenhum filho	23	9,5
	1 – 3 filhos	144	59,5
	> 3 filhos	70	28,9
	Ignorado	5	2,1
Consumo atual de tabaco	Não	145	59,5
	Sim, passado	9	3,7
	Sim, atual	82	33,9
	Ignorado	6	2,9
Uso atual de contraceptivo oral	Não	121	50,0
	Sim	106	43,8
	Ignorado	15	6,2
Sorologia para HIV	Não	239	98,8
	Sim	2	0,8
	Ignorado	1	0,4
Gestação prévia	Não	21	8,7
	Sim	217	89,7
	Ignorado	4	1,7
Histopatologia da biópsia pré-cone	Sem neoplasia	18	7,4
	NIC1	5	2,1
	NIC2+	213	88,0
	Ignorado	6	2,5
Histopatologia da peça cirúrgica (cone)	Sem neoplasia	17	7,0
	NIC1	18	7,4
	NIC2+	207	85,5
Margens cirúrgicas	Livres	140	57,9
	Comprometidas	97	40,1
	Ignorado	5	2,1
Extensão glandular	Não	104	43,0
	Sim	138	57,0
HPV de alto risco	Não	22	9,1
	Sim	220	90,9

Continuação. Tabela 2.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CATEGORIAS</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
HPV-16	Não	111	45,9
	Sim	131	54,1
HPV-18	Sim	14	5,8
	Ignorado	3	1,2
HPV de alto risco (não-16 / não-18)	Não	119	49,2
	Sim	121	50,0
	Ignorado	2	0,8
Imunoexpressão citoplasmática de p16(INK4A) (peça cirúrgica)	Negativo	80	33,1
	Positivo	157	64,9
	Ignorado	5	2,1
Imunoexpressão nuclear de p16(INK4a) (peça cirúrgica)	Não	54	22,3
	Sim	183	75,6
	Ignorado	5	2,1

Tabela 3 - Taxas de sobrevida livre de doença (2 anos) após a o tratamento cirúrgico de acordo com as variáveis do estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA (2 ANOS)	VALOR DE P
Idade	Até 30 anos	58	86,6	0,033
	31 – 45 anos	108	82,0	
	> 45 anos	62	69,8	
Idade de início da atividade sexual	< 16 anos	86	75,7	0,232
	16 anos ou +	112	84,2	
Paridade	Nenhum filho	21	80,7	0,288
	1 – 3 filhos	136	83,9	
	> 3 filhos	66	73,3	
Consumo de tabaco	Não / no passado	144	86,7	< 0,001
	Sim	77	66,0	
Uso atual de contraceptivo oral	Não / no passado	114	75,6	0,197
	Sim	99	82,7	
Gestação prévia	Não	19		0,646
	Sim	205		
Histopatologia (biópsia)	Sem neoplasia	18	80,2	0,008
	NIC1	5	40,0	
	NIC2+	199	81,2	
Histopatologia (peça cirúrgica)	Sem neoplasia	17	79,4	0,329
	NIC1	18	94,1	
	NIC2+	193	79,3	
Margens cirúrgicas	Livres	134	89,1	< 0,001
	Comprometidas	90	66,3	
Extensão glandular	Não	100	83,6	0,169
	Sim	128	76,9	
HPV de alto risco	Não	22	100,0	0,021
	Sim	206	77,6	
HPV-16	Não	108	90,2	< 0,001
	Sim	120	70,7	
HPV-18	Não	214	80,9	0,108
	Sim	11	63,6	
HPV de alto risco (não-16, não-18)	Não	109	76,6	0,222
	Sim	117	83,3	
Imunoexpressão citoplasmática de P16(INK4a) (peça cirúrgica)	Negativo	79	86,5	0,049
	Positivo	144	76,8	
Imunoexpressão nuclear de P16(INK4a) (peça cirúrgica)	Não	53	89,0	0,064
	Sim	170	77,6	

Tabela 4 - Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico (modelo de Cox).

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	HR	IC95%	VALOR DE P
HPV-16	Não	101	1,0	Referência	0,001
	Sim	116	3,3	1,6 – 6,9	
Margens	Livres	129	1,0	Referência	0,001
	Comprometidas	88	3,2	1,6 – 6,1	
Consumo de tabaco	Não / Passado	140	1,0	Referência	0,001
	Atual	77	3,0	1,6 – 5,6	
Idade	Até 30 anos	57	1,0	Referência	0,274
	31 – 45 anos	103	1,6	0,7 – 4,0	
	> 45 anos	57	2,7	1,1 – 6,7	

Tabela 5 - Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico em mulheres cujas margens cirúrgicas foram negativas (modelo de Cox).

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	HR	IC95%	VALOR DE P
HPV-16	Não	66	1,0	Referência	0,013
	Sim	63	13,6	1,7 – 106,2	
Consumo de tabaco	Não / Passado	88	1,0	Referência	0,303
	Atual	41	1,8	0,6 – 5,7	
Idade	Até 30 anos	36	1,0	Referência	0,728
	31 – 45 anos	63	1,3	0,3 – 5,7	
	> 45 anos	30	2,2	0,5 – 9,9	

Tabela 6 - Fatores de risco independentes para doença residual / recorrência de doença no colo do útero após o tratamento cirúrgico em mulheres cujas margens cirúrgicas foram positivas (modelo de Cox).

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	HR	IC95%	VALOR DE P
HPV-16	Não	35	1,0	Referência	0,056
	Sim	53	2,3	1,0 – 5,2	
Consumo de tabaco	Não / Passado	52	1,0	Referência	0,002
	Atual	36	3,5	1,6 – 7,6	
Idade	Até 30 anos	21	1,0	Referência	0,217
	31 – 45 anos	40	2,0	0,7 – 6,3	
	> 45 anos	27	2,8	0,9 – 9,3	

Tabela 7 – Pontos atribuídos a cada uma das variáveis consideradas para a construção dos escores prognósticos de acordo com os respectivos coeficientes de regressão.

VARIÁVEL	Coeficiente de regressão (Cox)	Pontos atribuídos			
		Score A	Score B	Score C	Score D
HPV-16 (+)	1,207	1	3	4	5
Margens cirúrgicas (+)	1,155	1	3	3	4
Consumo de tabaco	1,085	1	2	2	3
Idade > 45 anos	0,993	1	1	1	1

Tabela 8 – Taxas de sobrevida livre de doença em 2 anos e area under the curve (ROC curve) de acordo com os grupos de risco definidos pelos escores prognósticos.

Grupo de risco	Escore A (*1)		Escore B (*1)		Escore C (*1)		Escore D (*1)	
	N	2A-SLD (%)	N	2A-SLD (%)	N	2A-SLD (%)	N	2A-SLD (%)
Muito baixo risco	31	100.0	64	100.0	64	100.0	64	100.0
Baixo risco	80	90.9	49	83.3	58	80.7	58	80.7
Risco intermediário	64	75.9	83	73.9	74	74.8	74	74.8
Alto risco	42	49.4	21	32.0	21	32.0	21	32.0
<hr/>								
AUC (*)	0,783		0,791		0,781		0,781	
<hr/>								

2A-SLD: Sobrevida livre de doença em 2 anos

(1) Definição dos grupos de risco de acordo com a pontuação no escore:

Escore A: muito baixo risco (nenhum ponto), baixo risco (1 ponto), risco intermediário (2 pontos), alto risco (> 2 pontos)

Escore B: muito baixo risco (até 2 pontos), baixo risco (3 pontos), risco intermediário (4 a 7 pontos), alto risco (> 7 pontos)

Escore C: muito baixo risco (até 2 pontos), baixo risco (3 ou 4 pontos), risco intermediário (5 a 8 pontos), alto risco (> 8 pontos)

Escore D: muito baixo risco (até 3 pontos), baixo risco (4 ou 5 pontos), risco intermediário (6 a 10 pontos), alto risco (> 10 pontos)

(\*) AUC = Area under the curve. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as áreas

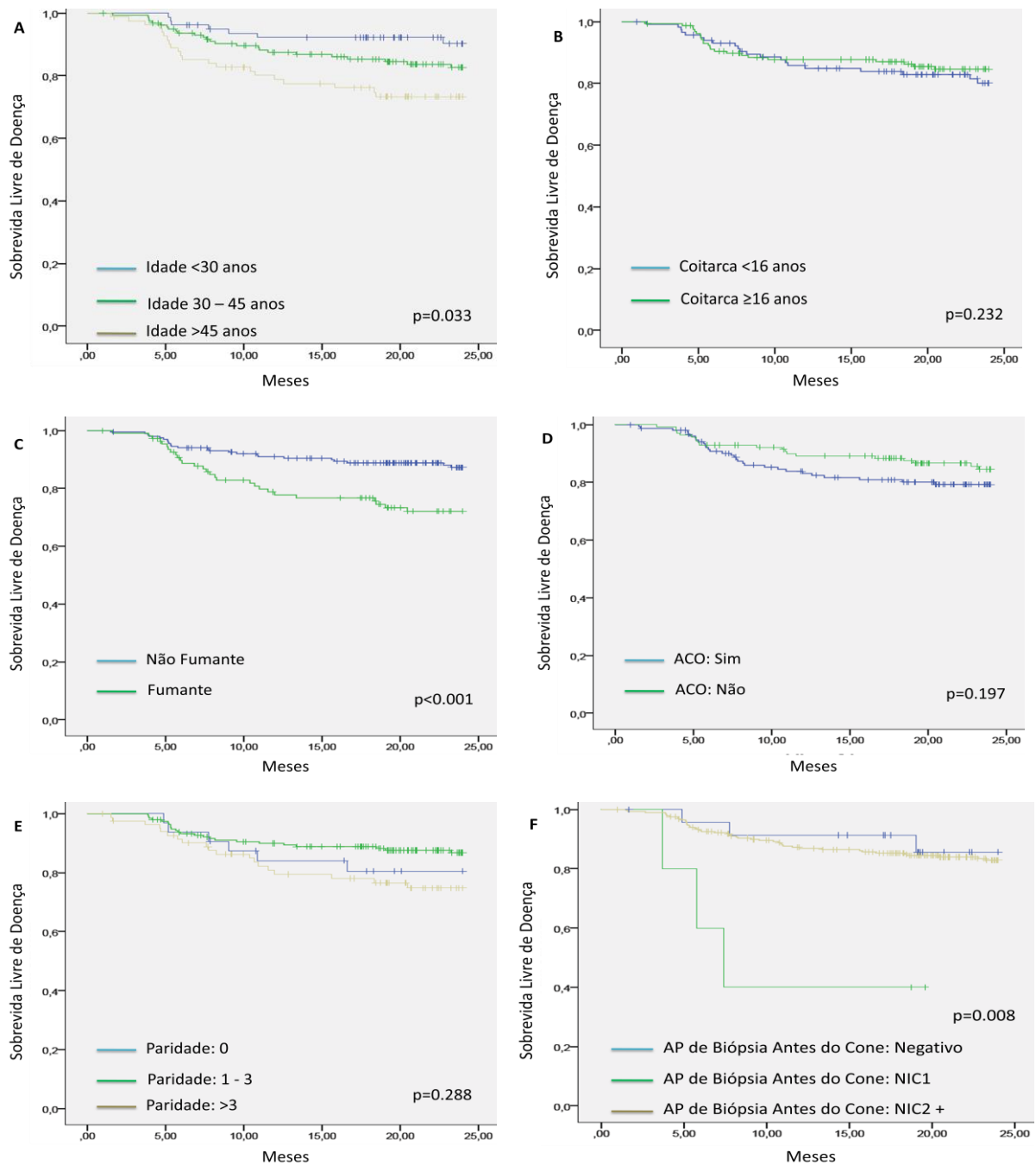
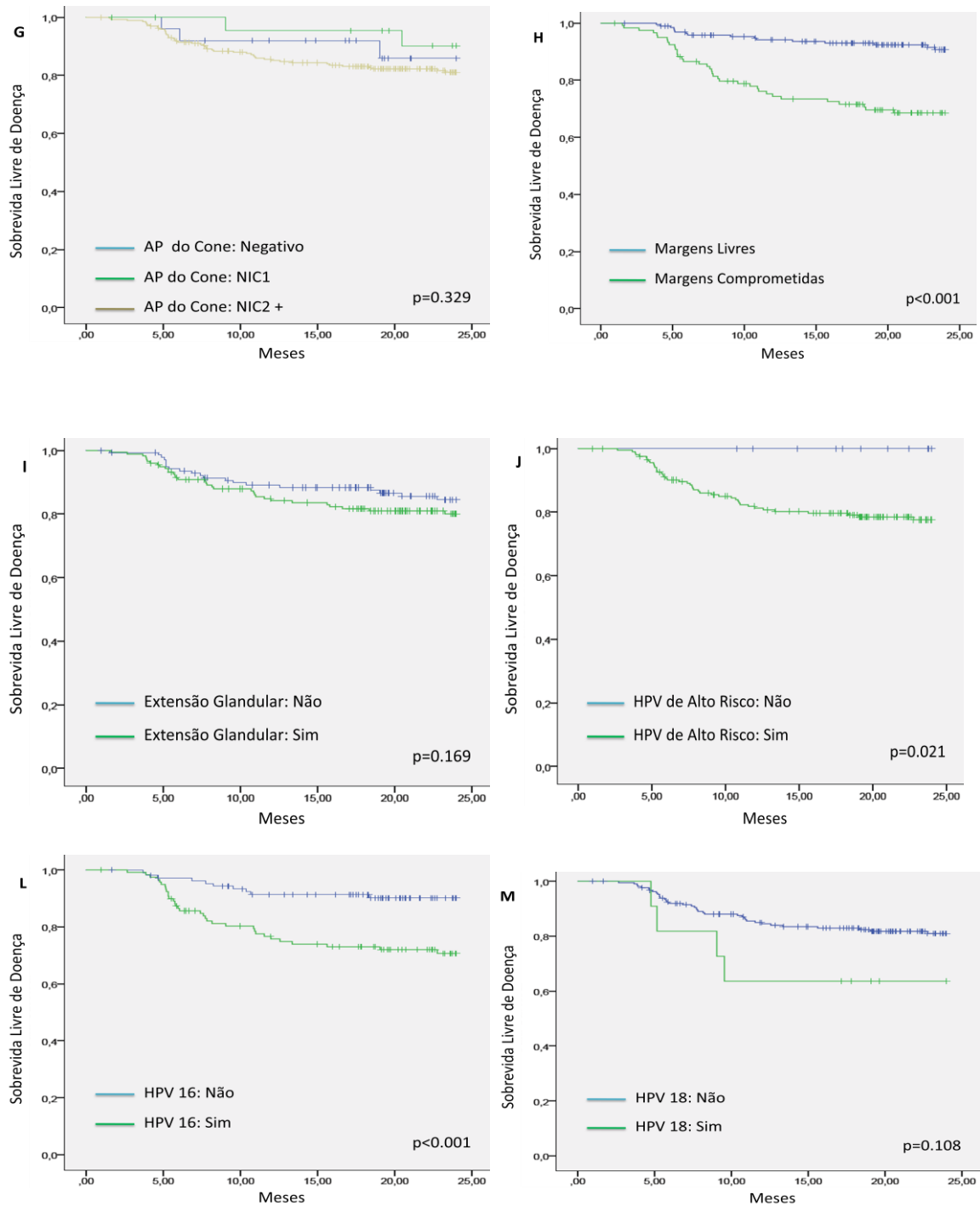
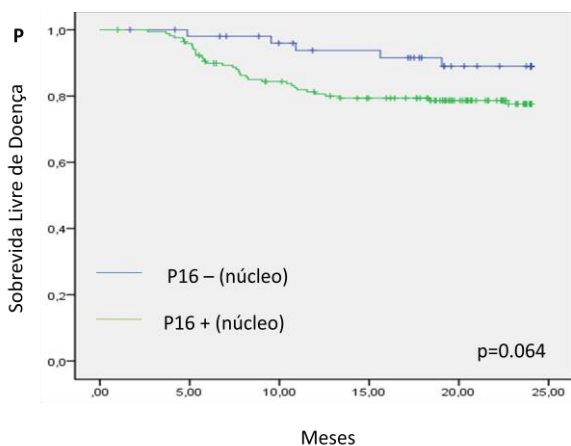
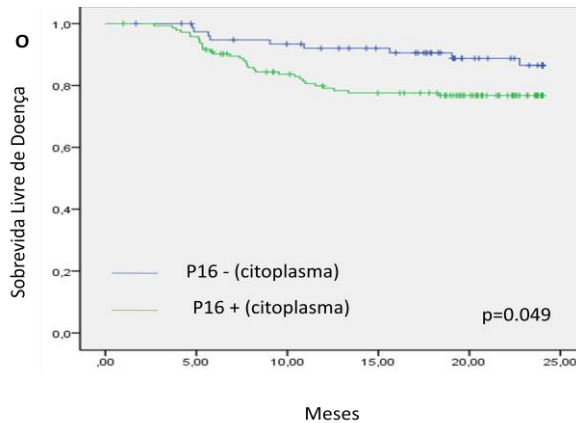
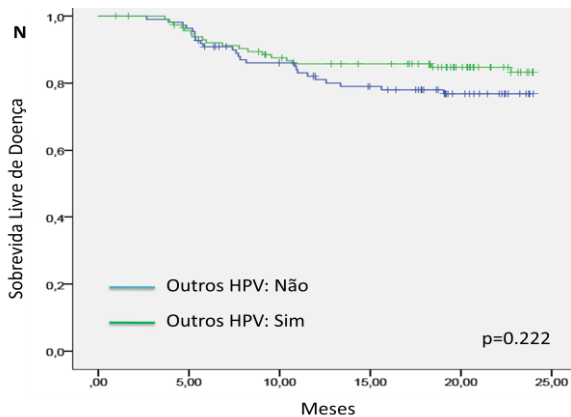


Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier para Sobrevida Livre de Doença em 2 Anos. As Variáveis Idade(A), Tabagismo(C), Anatomopatológico da Biópsia Pré-cone(F), Margens Cirúrgicas(H), Presença de HPV de Alto Risco(J), Presença do HPV-16(L) e imunopressão para P16 no citoplasma(O) apresentaram significância estatística, e foram posteriormente avaliadas pela análise multivariada. As variáveis Coitarca(B), Uso de Anticoncepcional Oral(D), Paridade(E), Anatomopatológico do Cone(G), Presença de Extensão Glandular(I), Presença de HPV-18(M), Presença de Outros tipos de HPV(N) e imunopressão para P16 no núcleo(P) não apresentaram significância estatística.





Continuação. Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier para Sobrevida Livre de Doença em 2 Anos. As Variáveis Idade(A), Tabagismo(C), Anatomopatológico da Biópsia Pré-cone(F), Margens Cirúrgicas(H), Presença de HPV de Alto Risco(J), Presença do HPV-16(L) e imunopositividade para P16 no citoplasma(O) apresentaram significância estatística, e foram posteriormente avaliadas pela análise multivariada. As variáveis Coitarca(B), Uso de Anticoncepcional Oral(D), Paridade(E), Anatomopatológico do Cone(G), Presença de Extensão Glandular(I), Presença de HPV-18(M), Presença de Outros tipos de HPV(N) e imunopositividade para P16 no núcleo(P) não apresentaram significância estatística.



Continuação. Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier para Sobrevida Livre de Doença em 2 Anos. As Variáveis Idade(A), Tabagismo(C), Anatomopatológico da Biópsia Pré-cone(F), Margens Cirúrgicas(H), Presença de HPV de Alto Risco(J), Presença do HPV-16(L) e imunopositividade para P16 no citoplasma(O) apresentaram significância estatística, e foram posteriormente avaliadas pela análise multivariada. As variáveis Coitarca(B), Uso de Anticoncepcional Oral(D), Paridade(E), Anatomopatológico do Cone(G), Presença de Extensão Glandular(I), Presença de HPV-18(M), Presença de Outros tipos de HPV(N) e imunopositividade para P16 no núcleo(P) não apresentaram significância estatística.

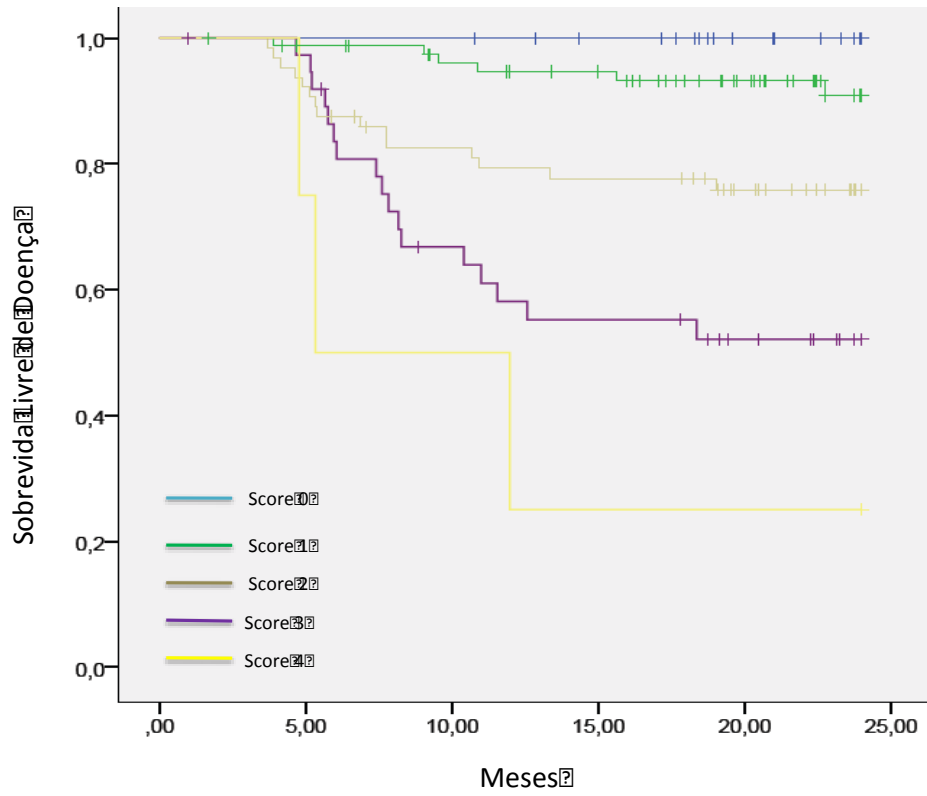


Figura 6. Curva de Kaplan-Meier para Sobrevida Livre de Doença em 2 Anos de acordo com o escore A para os fatores de risco.

## 5. DISCUSSÃO

Avaliar os fatores prognósticos envolvidos na recorrência de NIC após o tratamento cirúrgico tem importância para reduzir o risco de progressão para câncer invasivo. Até o momento, pouco se estudou a respeito de novos exames utilizados no rastreamento, como o teste COBAS para detecção de HPV®, em conjunto com outros fatores clínicos e patológicos já avaliados mais extensamente por estudos prévios como fatores prognósticos.

Este estudo apresenta um novo modelo prognóstico, que engloba tanto a realização do teste COBAS para detecção de HPV® no pré-operatório, como também os clássicos fatores clínicos e patológicos (idade, tabagismo, margem cirúrgica) envolvidos na recorrência/persistência da NIC.

Contudo, deve-se considerar as limitações do estudo, com um tempo de seguimento de apenas 2 anos, que pode ser curto para diagnosticar todas as pacientes que irão recorrer após o tratamento<sup>62</sup>. Porém a recorrência que ocorre após o período de 2 anos tem probabilidade menor de acontecer por falha do tratamento da NIC, e deve ocorrer por reinfecção por HPV de alto risco. Outro ponto de dificuldade no estudo é a definição de recorrência e persistência da doença, já que não há na literatura um parâmetro claro e definitivo para diferenciar estas duas situações. Neste estudo, definimos recorrência/persistência como as alterações comprovadas por biópsia (NIC 1 ou pior) ou apenas identificadas por alterações citológicas (lesões intra-epiteliais de alto ou baixo grau). Esta definição pode ser demasiadamente ampla e superestimaria a falha de tratamento. No entanto, estas são definições comuns na prática do ginecologista para definir investigação adicional de mulheres que estão em seguimento após o tratamento cirúrgico de NIC.

Neste estudo, a idade acima de 45 anos foi um fator de risco independente para recorrência na análise multivariada. Este resultado está de acordo com o reportado por Tyler e cols., em que se observou maior risco de recorrência após o tratamento cirúrgico a partir da 5ª década de vida<sup>23</sup>. Por outro lado, outros autores não correlacionaram idade com recorrência<sup>22,39,40,42</sup>. Ghaem-Maghami e cols. demonstraram que mulheres idosas apresentam mais falhas do tratamento devido a dificuldade do cirurgião em identificar o limite profundo da lesão, e portanto biópsias profundas, realizadas por cirurgiões experientes, resultariam em menor risco para falha do tratamento<sup>63</sup>. No presente estudo, no entanto, a idade acima de 45 anos foi um fator de risco para recorrência independentemente do status da margem cirúrgica, o que tornaria menos plausível a explicação dada por Ghaem-Maghami e cols.

O tabagismo é classicamente apontado como um fator de risco para progressão das neoplasias intra-epiteliais a partir da infecção por HPV de alto risco<sup>64</sup>. O mecanismo biológico pelo qual o tabaco influencia a carcinogênese e progressão da lesão não é claramente compreendido. Contudo, produtos carcinogênicos encontrados nos cigarros, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ou as nitrosaminas, têm potencial de transformações das células cervicais ou ainda de causar imunossupressão, permitindo a persistência da infecção pelo HPV e a progressão até o câncer<sup>64-66</sup>. Seu papel como fator prognóstico após o tratamento cirúrgico ainda é incerto. Em nossa análise a estimativa de risco relativo desta variável (consumo de tabaco) foi semelhante a dos demais fatores de risco, e sugere que seu papel na recorrência deva ser mais bem estudado. Supomos que mulheres fumantes, por terem maior dificuldade para o clareamento da infecção por HPV, devem ter maior chance de recorrência, mesmo após tratamento cirúrgico apropriado<sup>64</sup>.

O status da margem cirúrgica é atualmente o principal fator conhecido para recorrência de NIC após tratamento cirúrgico<sup>23,24,29,31</sup>. Contudo, o risco elevado de recorrência apresentado pelas pacientes com margem cirúrgica positiva não é suficiente para indicar uma nova intervenção cirúrgica. Estas pacientes com margem positiva que não recorrem no seguimento, poderiam ter sua lesão residual cauterizada durante o a hemostasia realizada após a ressecção do cone, ou o processo inflamatório causado pela regeneração do colo uterino pode promover o clareamento do vírus HPV. Ainda se deve considerar que mulheres com margens cirúrgicas negativas na peça cirúrgica também têm necessidade de seguimento após o tratamento, já que as taxas de recorrência não são desprezíveis neste grupo<sup>22,32</sup>. Nestes casos, a cirurgia não promoveria um clareamento viral e, portanto, permitiria que a persistência do HPV promovesse uma recorrência de NIC.

Diferente do que foi aqui mostrada, alguns autores reportaram que a detecção do HPV de alto risco, antes do tratamento cirúrgico, por si só não aumentaria o risco de recorrência<sup>37-42</sup>. Analisou-se também o valor da carga viral como fator de risco para recorrência supondo que cargas virais mais altas refletiriam infecções persistentes e maior risco de progressão<sup>40,42</sup>. Porém, o ponto de corte para esta medida ainda não está bem estabelecido e, mesmo usando diferentes valores, os estudos usando cargas virais tiveram resultados conflitantes como fator de risco para recorrência após a conização<sup>38,67</sup>.

Considerando-se a genotipagem, a presença do HPV-16 se mostrou um fator prognóstico significativo neste estudo, com um risco pelo menos três vezes maior de recorrência após a cirurgia. Este resultado corrobora os estudos prévios que mostraram a

infecção pelo HPV-16 como fator prognóstico para NIC<sup>39,44</sup>. E a determinação deste fator de risco é um diferencial importante para os exames que, além da detecção de HPV de alto risco, também fornecem a genotipagem para os HPVs de mais alto risco (HPV-16 e HPV-18), como o teste COBAS para detecção de HPV®. Pois quando realizado antes do tratamento cirúrgico, além de auxiliar no rastreamento de NIC, fornece informação prognóstica.

Ainda neste estudo, as peças cirúrgicas foram analisadas por estudo imunohistoquímico para a proteína p16(INK4A). Embora se tenha observado que a expressão citoplasmática da proteína relacionou-se com a sobrevida livre de doença na análise univariada, ela não foi identificada como fator de risco independente para recorrência na análise multivariada. Assim, a proteína p16(INK4A) não teve qualquer valor prognóstico nesta casuística, mas foi capaz de diferenciar as lesões intraepiteliais. NIC2 e NIC3 tiveram expressão imunohistoquímica de p16(INK4A) significativamente maior que NIC1 ou cervicites (dados não apresentados nos resultados). Estes resultados estão de acordo com os do estudo publicado por Branca e cols. que avaliou a importância do p16 em graduar as lesões intraepiteliais e também não encontrou significância da marcação para p16 como fator prognóstico após tratamento das lesões intraepiteliais<sup>52</sup>.

A partir dos fatores de risco para recorrência identificados na análise multivariada, elaboraram-se quatro modelos prognósticos. O modelo A é o mais simples de ser utilizado na prática clínica, porque atribui 1 ponto pela presença de qualquer dos fatores de risco, e a partir desta pontuação se determina o prognóstico da paciente. Os modelos prognósticos B, C e D dão gradativamente maior pontuação para as variáveis com maiores valores de hazard ratio. Contudo, além da maior complexidade em se calcular a pontuação, os modelos prognósticos B, C e D não demonstraram maior capacidade de predição que o escore A (análise de curva ROC). Portanto, elegemos o escore A como o mais adequado para o uso na prática clínica diária.

A utilização de um escore prognóstico após o tratamento cirúrgico teria implicação no padrão de seguimento. As mulheres cujo escore fosse de muito baixo risco (0 ponto) poderiam teoricamente retornar a rotina de rastreamento. As pacientes com escore de baixo risco (1 ponto) poderiam ser seguidas semestralmente por 2 anos apenas com citologia cervical. Aquelas mulheres classificadas pelo escore como de risco intermediário (3 pontos) ou alto (4 pontos) obrigatoriamente deveriam incluir o teste de detecção para HPV em seu seguimento. Com isto, o custo-benefício seria maximizado no período pós-tratamento.

Estudos adicionais ainda devem ser realizados para se avaliar a utilidade deste escore em uma população diferente, que pode apresentar uma frequência de genótipos diferentes de HPV de alto risco. Além disso, deve-se averiguar os fatores prognósticos em uma coorte de mulheres com um tempo de seguimento mais longo, pois recorrências tardias podem ocorrer e também aumentam o risco para surgimento do câncer invasivo do colo uterino.

Em resumo, este estudo propôs a criação do escore que parece representar uma ferramenta valorosa na determinação do risco de recorrência de NIC após o tratamento cirúrgico. A utilização de fatores clínicos (idade e tabagismo), patológicos (margem cirúrgica) e moleculares (detecção do HPV-16) poderia direcionar um seguimento mais apropriado para as pacientes, de acordo com sua estratificação de risco. Isto permitiria a incorporação de novas tecnologias de forma racional, com melhor relação custo-benefício no seguimento das pacientes após o tratamento cirúrgico.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir:

1. Na análise univariada, a sobrevida livre de recorrência / persistência em 2 anos esteve associada com as seguintes variáveis: idade acima de 45 anos, consumo de tabaco, diagnóstico histopatológico na biópsia com lesão NIC1, margens cirúrgicas comprometidas, presença de HPV de alto risco, presença de HPV-16 e imunoe expressão de p16(INK4A) no citoplasma.
2. Os fatores de risco independentes para recorrência / persistência foram: tabagismo (HR=3,0; IC95%:1,6-5,6), margens cirúrgica positivas (HR=3,2; C95%:1,6-6,1), presença do HPV-16 (HR=3,3; IC95%:1,6-6,9) e idade acima de 45 anos (HR=2,7;IC95%:1,1-6,6).
3. A identificação dos fatores de risco para recorrência / persistência permitiu a construção de quatro escores. Todos mostraram capacidade de predição semelhante através da análise da curva ROC. Um deles, mais simples, foi eleito para o uso na prática clínica diária e considerou as seguintes pontuações: Um ponto para cada fator de risco independente (tabagismo, margens cirúrgicas positivas, presença do HPV-16 e idade acima de 45 anos).Paciente que pelo escore A não apresentou pontuação foi classificada como muito baixo risco, com sobrevida livre de doença em 2 anos (SLD em 2 anos) de 100%. Com um ponto a paciente é classificada como baixo risco e SLD em 2 anos 90,9%. Paciente com dois pontos é do risco intermediário e SLD em 2anos 75,9%. Já as pacientes com pontuação >2 pontos são classificadas como alto risco e apresentam SLD em 2 anos de 49,4%.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Globocan 2008 (IARC). Section of Cancer Information (26/03/2013). [www.globocan.iarc.fr/factsheet.asp](http://www.globocan.iarc.fr/factsheet.asp)
2. Ministério da Saúde. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2011.
3. Rosa MI, Medeiros LR, Rosa DD, Bozzetti MC, Silva FR, Silva BR. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública* 2009; 25: 953-64.
4. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 90. Human papillomavirus. IARC Working Group Meeting: 2005; Lyon, France. WHO; 2006.
5. deSanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453-9.
6. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjosé S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26: K1 - K16.
7. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* 2010; 117: S5 – S10.
8. Boulet GAV, Horvath CA, Berghmans S, Bogers J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 810 – 7.
9. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: S4 – S7.
10. Castle PE, Stoler MH, Wright Jr C, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 880 – 90.
11. Reuschnbach M, Clad A, Doeberitz CK, Wentzensen N, Rahmsdorf J, Schaffrath F, et al. Performance of p16<sup>INK4a</sup>-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 98 – 105.

12. Wheeler CM. Human Papillomavirus Genotype Distributions: Implications for Vaccination and Cancer Screening in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 475 – 87.
13. Davis-Devine S, Day SJ, Anderson A, French A, Madison-Hennessy, Mohar N, et al. Collection of the BD SurePath Pap Test with a broom device plus endocervical brush improves disease detection when compared to the broom device alone or the spatula plus endocervical brush combination. *Cytojournal* 2008; 6:4.
14. Nance KV. Evolution of Pap Testing at a community hospital – A ten year experience. *Diagnostic Cytopathology* 2006; 35: 148 – 53.
15. The ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 147 – 72.
16. Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H, et al. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: Diagnostic and prognostic implications. *Oncology Reports* 2008; 19: 457 – 65.
17. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186 – 92.
18. Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol* 2006; 59: 1017 – 28.
19. Soutter WP, Sasieni P, Panoskaltsis T. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2006; 118: 2048 – 55.
20. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Mendley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 425 – 34.
21. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment of CIN: a systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 205 – 11.

22. Costa S, Nuzzo M, Infante FE, Bonavita B, Marinelli M, Rubino A, et al. Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 119 – 24.
23. Tyler LN, Andrews N, Parrish RS, Hazlett LJ, Korourian S. Significance of margin and extent of dysplasia in loop electrosurgery excision procedure biopsies performed for high-grade squamous intraepithelial lesion in predicting persistent disease. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 622 – 4.
24. Serati M, Siesto G, Carollo S, Formenti G, Riva C, Cromi A, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. *Eur J Obstet Gyn Rep Biol* 2012; 165: 86 – 90.
25. Huang LW, Hwang JL. A comparison between loop electrosurgical excision procedure and cold knife conization for treatment of cervical dysplasia: residual disease in a subsequent hysterectomy specimen. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 12 – 5.
26. Panna S, Luanratanakorn S. Positive margin prevalence and risk factors with cervical specimens obtained from loop electrosurgical excision procedures and cold knife conization. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2009; 10: 637 – 40.
27. Zeng SY, Liang MR, Li LY, Wu YY. Comparison of the efficacy and complications of different surgical methods for cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaec Oncol* 2012; 3: 257 – 60.
28. Trimble EL. Cervical cancer state-of-the-clinical-science meeting on pretreatment evaluation and prognostic factors, September 27-28, 2007: Proceedings and recommendations. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 145 – 50.
29. Kim HJ, Kim KR, Mok JE, Nam JH, Kim YT, Kim YM, et al. Pathologic risk factors for predicting residual disease in subsequent hysterectomy following LEEP conization. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 434 – 8.
30. Narducci F, Occelli B, Boman F, Vinatier D, Leroy JL. Positive margins after conization and risk of persistent lesion. *Gynecol Oncol* 1999; 76: 311 – 4.
31. Dobbs SP, Asmussen T, Nunns D, Hollingworth J, Brown LJR, Ireland D. Does histological incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia following large loop excision of transformation zone increase recurrence rates? A six year cytological follow up. *British J Obstet Gyn* 2000; 107: 1298 – 301.

32. Orbo A, Arnesen T, Arnes M, Straume B. Resection margins in conization as prognostic marker for relapse in high-grade dysplasia of the uterine cervix in northern Norway: a retrospective long-term follow-up material. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 479 – 83.
33. Takac I. Human papillomavirus infection in patients with residual or recurrent cervical intraepithelial neoplasia. *Tumori* 2008; 94: 83 – 6.
34. Cobas HPV Test. Branchburg NJ: Roche Molecular Systems, Inc; 2011. Disponível no site [www.HPV16and18.com](http://www.HPV16and18.com).
35. Meijer CJLM, Berkhof H, Heideman DAM, Hesselink AT, Snijders PJF. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *J Clin Virology* 2009; 46: S1 – S4.
36. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 46.e1 – 11.
37. Laguevaque P, Motton S, Decharme A, Soulé-Tholy M, Escourrou G, Hoff J. Predictors of recurrence in high-grade cervical lesions and a plan of management. *EJSO* 2010; 36: 1073 – 9.
38. Kang WD, Oh MJ, Kim SM, Nam JH, Park CS, Choi HS. Significance of human papillomavirus genotyping with high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by a loop electrosurgical excision procedure. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 72.e1-6.
39. Nam K, Chung S, Kim J, Jeon S, Bae D. Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. *J Gynecol Oncol* 2009; 20: 91 – 5.
40. Alonso I, Torne A, Puig-Tintore LM, Esteve R, Quinto L, Campo E, et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 631 - 6.
41. Song SH, Lee JK, Oh MJ, Hur JY, Na JY, Park YK. Persistent HPV infection after conization in patients with negative margins. *Gynecol Oncol* 2006; 101: 418 – 22.
42. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 549 – 54.
43. Sideri M, Igidbashian S, Boveri S, Radice D, Casadio C, Spolti N, et al. Age distribution of HPV genotypes in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 510 – 3.
44. Gok M, Coupé VMH, Berkhof J, Verheijen RHM, Helmerhorst TJM, Hogewoning CJA, et al. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 273 –5.

45. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. P16<sup>INK4a</sup> immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2009 May; 35: 210–20.
46. Lesinkova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagnostic Pathology* 2009; 4: 22-8.
47. Izadi-Mood N, Asadi K, Shojaei H, Sarmadi S, Ahmadi SA, Sani S, et al. Potential diagnostic value of P16 expression in premalignant and malignant cervical lesions. *J Res Med Sci* 2012; 17: 428-33.
48. Reuschenbach M, Seiz M, Doeberitz CK, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, et al. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer* 2011; 130: 388-94.
49. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, et al. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch* 2004; 445: 616-20.
50. Ovestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, Malpica A, Munk AC, Janssen EA, et al. The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. *J Clin Pathol* 2011; 64: 303-7.
51. 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.
52. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, et al. p16(INK4a) expression is related to grade of cin and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 354-65.
53. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 168-76.
54. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, et al. The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia: predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 207-11.

55. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006; 208: 152-64.
56. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 2008; 19: 29-41.
57. Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, et al. Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16<sup>INK4a</sup>. *Int J Oncol* 2006; 29: 705-11.
58. Waldstrom M, Ornskov D. Comparison of the clinical performance of an HPV mRNA test and an HPV DNA test in triage of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). *Cytopathol* 2012; 23: 389-95.
59. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghata P, et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 assay precancer and cancer. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 557-64.
60. Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GYF, Burk RD, Ketz J, et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 483-8.
61. Sarkar AK, Tortolero-Luna G, Follen M, Sastry KJ. Inverse correlation of cellular immune responses specific to synthetic peptides from the E6 and E7 oncoproteins of HPV-16 with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in a cross-sectional study. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 251-61.
62. Roncaglia MT, Tacla M, Vieira da Motta E, Caiaffa H, Ab'Saber A, Alves VA, et al. Evaluation of the combination of cytology and hybrid capture to safely predict the high-grade lesion status of patients treated with conization with large loop excision of the transformation zone. *Acta Cytol* 2011;55(5):421-5.
63. Ghaem-Maghami S, De-Silva D, Tipples M, Lam SJ, Perryman K, Soutter WP. Determinants of success in treating cervical intraepithelial neoplasia. *BJOG* 2011; 118: 679-84.
64. Guarisi R, Sarian LO, Hammes LS, Longatto-Filho A, Derchain SF, Roteli-Martins C, et al. Smoking worsens the prognosis of mild abnormalities in cervical cytology. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88: 514-20.

65. Louie KS, Castellsague X, de Sanjose S, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, et al. Smoking and passive smoking in cervical cancer risk: Pooled analysis of couples from
66. the IARC multicentric case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1379-90.
67. Prokopczyk B, Trushin N, Leszczynska J, Waggoner SE, El-Bayoumy K. Human cervical tissue metabolizes the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, via  $\alpha$ -hydroxylation and carbonyl reduction pathways. *Carcinogenesis* 2001; 22: 107-14.
68. Ryu A, Nam K, Kwak J, Kim J, Jeon S. Early human papillomavirus testing predicts residual/recurrent disease after LEEP. *J Gynecol Oncol* 2012; 23: 217-25.

**ANEXO A**

**FICHA DE COLETA DE DADOS  
MARCADORES PROGNÓSTICOS E DE  
RESPOSTA AO TRATAMENTO  
PARA NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS  
DO COLO UTERINO**



<b>IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE</b>			
1	Número da Ficha		1
2	Nome da Paciente (Iniciais)		2
3	RGH		3
4	Data de Admissão	DD/MM/AAAA	4
5	Data de Nascimento	DD/MM/AAAA	5
<b>DADOS CLÍNICOS</b>			
6	Tabagismo	0- Não; 1- Sim, passado; 2- Sim, atual; 99- Ignorado	6
7	Tempo de Tabagismo	ANOS	7
8	Coitarca	IDADE	8
9	Usa Anticoncepcional	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	9
10	Gravidez Prévia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	10
11	HIV +	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	11
12	Outras DST's (Hepatite B e C / Sífilis)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	12
<b>DADOS DO ANATOMO ANTES DA CIRURGIA</b>			
13	Resultado da Citologia	1-LIEAG; 2- LIEBG; 3- Negativo; 4- Carcinoma Invasor; 5- ASCUS; 6- ASCH; 7- AGC; 9- AGUS; 10- Outro _____; 99- Ignorado	13
14	Data da Citologia	DD/MM/AAAA	14
15	Resultado da Biópsia do Colo	1- NIC I; 2- NIC II; 3- NIC III; 4- Cervicite; 5- Metaplasia; 6- CA invasor; 7- Outro _____; 99- Ignorado	15
16	Data da Biópsia	DD/MM/AAAA	16
<b>DADOS DO ANATOMO DO CONE</b>			
17	Data do Cone	DD/MM/AAAA	17
18	Anátomo do Cone	1- NIC I; 2- NIC II; 3- NIC III; 4- Cervicite; 5- Metaplasia; 6- CA invasor; 7- Outro _____; 99- Ignorado	18
19	Extensão Glandular	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	19
20	Margem		20



	<b>1-Comprometida; 2- Livres; 3- Não Avaliáveis; 99- Ignorado</b>		
<b>21</b>	Margem Endocervical Comprometida <b>0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado</b>	<b>21</b>	
<b>22</b>	Margem Ectocervical Comprometida <b>0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado</b>	<b>22</b>	
<b>23</b>	Data do Retorno para Coleta de Citologia Base Líquida <b>DD/MM/AAAA</b>	<b>23</b>	
<b>24</b>	Citologia do Retorno <b>1- LIEAG; 2- LIEBG; 3- Negativo; 4- Carcinoma Invasor; 5- ASCUS; 6- ASCH; 7- Outro; 99- Ignorado</b>	<b>24</b>	
<b>25</b>	Recaída <b>0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado</b>	<b>25</b>	
<b>26</b>	Data da recaída <b>DD/MM/AAAA</b>	<b>26</b>	
<b>27</b>	Data do Último Seguimento <b>DD/MM/AAAA</b>	<b>27</b>	
<b>28</b>	Seguimento <b>1- Ausência de Neoplasia; 2- Recaída para LIE; 3- Progressão para Carcinoma Invasor</b>	<b>28</b>	
<b>29</b>	Região do Brasil <b>1- Norte; 2- Nordeste; 3- Centro-Oeste; 4- Sudeste; 5- Sul.</b>	<b>29</b>	

## ANEXO B



Espaço para etiqueta

CDG 9

### Termo de Informação e Consentimento

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o corpo clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em tumores, de novos genes ou lesões em genes já existentes. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removidos em cirurgias, ou em material biológico colhido.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade de remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então congelado e armazenado para novos exames se necessários. Caso contrário, são descartados, conforme legislação sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou na extensão da mesma. O projeto de pesquisa proposto que vier utilizar este material será previamente apresentado à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital.

O fragmento de tumor e/ou material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identificação serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética Médica, pelo telefone (17) 3321-6600.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este termo, se consentir.

### Declaração

**Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.**

Barretos, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

### Responsável ou Paciente

Nome: \_\_\_\_\_

R G: \_\_\_\_\_ RGH: \_\_\_\_\_


# ANEXO C

Gynecologic Oncology: PI x Elsevier Editorial SystemTI x

ees.elsevier.com/yygyno/default.asp

Do you want Google Chrome to save your password? Save password Never for this site

## Gynecologic Oncology

Contact us Help ?  [New - Part II of our Editors' Update Ethics Special is now live!](#)

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: andrade.cem@ig.com.br Role: Author

Version: [EES 2013.9](#)

### Submissions with an Editorial Office Decision for Author Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
<a href="#">Action Links</a>	GYN-13-813	Prognostic scores after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia: a proposed model and possible implications for post-operative follow-up.	Aug 23, 2013	Sep 11, 2013	Completed - Reject	Sep 11, 2013	Reject

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.



Windows taskbar showing icons for Internet Explorer, File Explorer, VLC, Google Chrome, and Microsoft Word. System tray shows PT, volume, network, and date/time: 22:02 08/11/2013.

## ANEXO D

HOSPITAL  
BARRETOS



Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP

Para: Dr. Carlos Eduardo Andrade  
De : Dr. Eduardo José Paton  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 14/05/2010

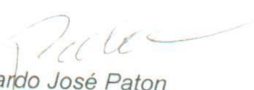
Projeto de Pesquisa: **330/2010**

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou em reunião ordinária de 13/05/2010 o projeto de pesquisa **330/2010** “**Marcadores Prognósticos e de Resposta ao Tratamento para Neoplasias Intra-epiteliais do Colo Uterino**” e decidiu que o mesmo encontra-se: “Aprovado”.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestrais e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

  
Dr. Eduardo José Paton  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital de Câncer de Barretos

Rua Antenor Duarte Villela, 1331 – B. Dr. Paulo Prata – Barretos – SP CEP 14784-400 – CNPJ 49.150.352/0001-12  
Tel. 17 33216600 R. 6894 – [cep@hcancerbarretos.com.br](mailto:cep@hcancerbarretos.com.br)