

JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE

**DETECÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL BASEADA EM COMBINAÇÕES DE
CITOLOGIA CERVICAL, PESQUISA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO E PERFIL DE METILAÇÃO
DE GENES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da
Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Barretos – São Paulo

2020

JÚLIO CÉSAR POSSATI RESENDE

**DETECÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL BASEADA EM COMBINAÇÕES DE
CITOLOGIA CERVICAL, PESQUISA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO E PERFIL DE METILAÇÃO
DE GENES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da
Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

ORIENTADOR: Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Barretos – São Paulo

2020

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Parte desse trabalho recebeu financiamento por meio do projeto PPSUS-SP 2012 (Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde do Estado de São Paulo) gestão compartilhada FAPESP/SES-SP/MS/CNPq (processo número 2012/51221-4).

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

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, 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.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico à Íris, minha companheira de vida que divide comigo os sonhos e constrói com alicerces robustos a base dessa família linda que justifica todos os nossos esforços. À nossa sapeca Mariana que transborda vitalidade e enche de alegria nossos dias e ao nosso tesouro Arthur que nos ilumina com sua bondade e sensibilidade nos fazendo acreditar em um mundo melhor no futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido amigo orientador Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, pelos anos de parceria apoiando meu aprendizado na vida científica e na condução na estruturação e amadurecimento do serviço de prevenção de câncer ginecológico do Hospital de Câncer de Barretos. Agradeço o olhar generoso que sempre permeou nossa relação em incontáveis horas simulando dezenas de estratégias que possam no futuro beneficiar as brasileiras. Especialmente agradeço a oportunidade de compartilhar tantos momentos com alguém que admiro pela inteligência e se tornou fonte de inspiração, algo tão raro e precioso atualmente.

Ao Dr. Adhemar Longatto Filho, pela disponibilidade em me auxiliar e dividir tão vasta experiência em pesquisa. Agradeço o estímulo para me manter no caminho da ciência e apresentar com entusiasmo genuíno continuamente novas propostas de estudos e parcerias.

Aos Drs. Fábio Bastos Russomano e Rui Manuel Vieira Reis, pelas valiosas críticas e sugestões na elaboração e condução do projeto de Doutorado durante as bancas de acompanhamento e qualificação.

Aos amigos Márcio Antoniazzi e Bruno de Oliveira Fonseca, pelo companheirismo inabalável e por acreditarem na missão da medicina de construir uma saúde pública igualitária e eficiente. Agradeço ainda pelos inúmeros momentos em que permaneceram sobrecarregados quando precisei me ausentar do consultório.

A todos os colaboradores do Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos pelo empenho à causa do câncer cervical e profissionalismo admirável. As ***profissionais do Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP)*** do Setor de Prevenção, em especial agradeço a brilhante ***Naitielle de Paula Pantano*** pelo auxílio fundamental nesse trabalho.

À Dra. Graziela de Macêdo Matsushita, pela parceria e empenho à patologia ginecológica.

Aos colegas pesquisadores no Centro de Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, sobretudo os ***Drs. Henrique César Santejo Silveira e Caroline Domingues Rogeri***.

Às pacientes do Ambulatório de Ginecologia sem as quais não haveria a motivação desse estudo.

*“Muitas coisas não ousamos empreender por parecerem difíceis,
entretanto, são difíceis porque não ousamos empreendê-las.”*

Sêneca

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer do colo do útero	1
1.2	História natural do câncer do colo do útero	4
1.3	Emprego do teste de Papanicolaou no rastreamento do câncer cervical	5
1.4	Teste de HPV no rastreamento do câncer cervical	8
1.5	Eventos epigenéticos – metilação do DNA	11
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Delineamento do estudo	19
3.2	População do estudo	19
3.3	Metodologia	21
3.3.1	Coleta de material biológico e exame colposcópico	22
3.3.2	Processamento e leitura da citologia em meio líquido	25
3.3.3	Deteção qualitativa de HPV de alto risco oncogênico	25
3.3.4	Análise de metilação do DNA	26
3.4	Estratégias para deteção de NIC2+	27
3.5	Análise estatística	28
3.6	Aspectos Éticos	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Descrição dos resultados dos testes citológico, molecular para pesquisa de HPV de alto risco e histológicos	31
4.2	Descrição das estratégias simuladas para deteção de NIC2+	33
4.2.1	Descrição das estratégias considerando o emprego de citologia e HPV (referência de comparação ASC-H+)	34
4.2.2	Descrição das estratégias considerando o emprego de citologia, HPV e metilação do DNA (referência de comparação ASC-H+)	40

4.2.3	Descrição das estratégias considerando o emprego de HPV e metilação do DNA (referência de comparação HPV+)	46
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	80
	Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	80
	Anexo B – Parecer Consubstanciado do CEP	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Os gráficos apresentam os índices de incidência e mortalidade considerando-se os 10 tipos de cânceres mais comuns entre as mulheres para o ano de 2018 (os cânceres de pele não melanoma estão incluídos na categoria “outros”).....1
- Figura 2** - Distribuição proporcional dos principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 para o sexo feminino, exceto pele não melanoma..... 2
- Figura 3** - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres brasileiras, estimadas para o biênio 2018-19, segundo Unidade da Federação - Neoplasia Maligna do Colo do Útero.3
- Figura 4** – Critérios estabelecidos pelas diretrizes brasileiras para o rastreamento populacional do câncer do colo do útero.....6
- Figura 5** – Fluxograma de tomada de decisão para gerenciamento de programas de rastreio de câncer do colo do útero..... 9
- Figura 6** - Metilação em dinucleotídeos CpG isolados no corpo do gene e em sequências repetitivas..... 13
- Figura 7** - Genes candidatos a biomarcadores diagnósticos de metilação do DNA para o câncer do colo do útero..... 15
- Figura 8** - Diagrama representativo das mulheres incluídas no estudo de acordo com os critérios dos exames colposcópico, citológico, histológico e molecular para pesquisa de HPV.21
- Figura 9** – Fluxograma de trabalho e distribuição das amostras biológicas no estudo.....23
- Figura 10** – Esquematização das estratégias simuladas para a detecção de NIC2+ considerando-se a associação entre 2 ou mais testes.28
- Figura 11** – Quantidade de estratégias simuladas para detecção de NIC2+ de acordo com os testes empregados e o modelo de referência para comparação.34

Figura 12 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 63,0% e razão de colposcopia de até 1,5).....	39
Figura 13 – Esquematização das estratégias que demonstraram taxas de sensibilidade superiores a 80% e razão de colposcopia de até 1,5.	39
Figura 14 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 60,8% e razão de colposcopia de até 1,5).....	45
Figura 15 – Esquematização das estratégias que demonstraram taxas de sensibilidade superiores a 80% e razão de colposcopia de até 1,5.	45
Figura 16 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 80% e razão de colposcopia menor que 1,0).....	48
Figura 17 – Fluxograma representativo da estratégia número 2.	54
Figura 18 – Fluxograma representativo da estratégia número 20.	55
Figura 19 – Fluxograma representativo da estratégia número 32.	55
Figura 20 – Fluxograma representativo da estratégia número 33.	56
Figura 21 – Fluxograma representativo da estratégia número 14.	56
Figura 22 – Fluxograma representativo da estratégia número 104.	58
Figura 23 – Fluxograma representativo da estratégia número 100.	59
Figura 24 – Esquematização das taxas de sensibilidade e especificidade das 17 estratégias simuladas para detecção de NIC2+ considerando-se os testes de HPV e metilação.....	60
Figura 25 – Fluxograma representativo da estratégia número 80'.	61

Figura 26 – Fluxograma representativo da estratégia número 95'.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios combinados para definição de status diagnóstico baseado na classificação da JEC, achados colposcópicos, biópsia e citologia cervical.....	24
Tabela 2 - Processos biológicos e localização cromossômica dos genes abordados no estudo.	27
Tabela 3 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis idade da população, características do exame colposcópico e resultados dos testes citológicos, HPV e histopatológicos.	31
Tabela 4 – Distribuição dos casos de acordo com o resultado da citologia, teste do HPV e o status diagnóstico.....	33
Tabela 5 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes isolados (citologia e HPV) na detecção de NIC2+.....	35
Tabela 6 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de cotestes (citologia e HPV) na detecção de NIC2+.....	36
Tabela 7 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes reflexos (com combinação de citologia e HPV) na detecção de NIC2+.....	37
Tabela 8 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas utilizando-se testes isolados (metilação) na detecção de NIC2+.....	41
Tabela 9 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de cotestes (citologia, HPV e metilação) na detecção de NIC2+.....	42
Tabela 10 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes reflexos (com combinação de citologia, HPV e metilação) na detecção de NIC2+.....	43
Tabela 11 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas utilizando-se HPV e metilação e tendo como referência o emprego isolado de HPV+ na detecção de NIC2+.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenocarcinoma
AGC	Células glandulares atípicas de significado indeterminado
AIS	Adenocarcinoma “in situ”
ALTS	<i>ASC-US / LSIL Triage Study</i>
APC	<i>WNT signaling pathway regulator</i>
ASC-H	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas
C13ORF18	Símbolo oficial: <i>RUBCNL – RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein like</i>
CADM1	<i>Cell Adhesion Molecule 1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CE	Curetagem endocervical
CEC	Carcinoma espinocelular
CH3	Radical Metil
CpG	Dinucleotídeo 5'-CG-3'
DAPK1	<i>Death Associated Protein Kinase 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA metiltransferase
E	Especificidade
E6	Proteína oncogênica do Papilomavírus humano
EPB41L3	<i>Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 Like 3</i>
et al.	“e outros”
EUA	Estados Unidos da América

HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HC2	Teste de captura híbrida II
HE	Hematoxilina-eosina
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HPV	Papilomavírus humano (<i>human papillomavirus</i>)
HPV-AR	Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
HPV-BR	Papilomavírus humano de baixo risco oncogênico
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IST	Infecção sexualmente transmissível
JAM3	<i>Junctional Adhesion Molecule 3</i>
JEC	Junção escamo-colunar
L1	Proteína do capsídeo do HPV
LIEAG	Lesão escamosa intraepitelial de alto grau
LIEBG	Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau
LMX1A	<i>LIM Homeobox Transcription Factor 1</i>
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
MAL	<i>mal, T-cell differentiation protein</i>
NIC1	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 1
NIC2	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 2
NIC3	Neoplasia intraepitelial cervical de grau 3
NIC2+	Indica presença de lesão intraepitelial cervical de grau 2 ou mais grave
NIC3+	Indica presença de lesão intraepitelial cervical de grau 3 ou mais grave
NJ	Nova Jersey
NKX6-1	<i>NK6 Homeobox 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX1	<i>Paired box 1</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase
QMSP	<i>Quantitative Methylation Specific PCR</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
S	Sensibilidade
SOX1	<i>SRY-Box 1</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TF	Fator de transcrição
UM	Unidade móvel
VIA	Inspeção visual após aplicação de ácido acético
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
=	Igual a
%	Porcentagem
+	Positivo/superior
®	Marca registrada
β	Beta
↑	Aumento no índice avaliado com significância estatística
↓	Decréscimo no índice avaliado com significância estatística

RESUMO

Possati-Resende JC. *Detecção de lesões precursoras e câncer cervical baseada em combinações de citologia cervical, pesquisa de Papilomavírus Humano e perfil de metilação de genes. Tese (Doutorado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

JUSTIFICATIVA: O câncer do colo do útero constitui importante problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, com altas taxas de incidência e mortalidade. Apesar da contribuição dos exames citológicos de Papanicolaou estes apresentam grande variação na sua sensibilidade o que tem estimulado a busca por novas opções nas estratégias de rastreio. Os testes moleculares para pesquisa de HPV de alto risco e mais recentemente a presença de hipermetilação de alguns genes específicos constituem marcadores que podem melhorar a acurácia dos modelos que atualmente empregam o Papanicolaou isoladamente. **OBJETIVO:** Avaliar o desempenho de diferentes estratégias para detecção de lesões precursoras e câncer cervical por meio de combinações entre citologia, pesquisa do HPV de alto risco e perfil de metilação de genes hsa-miR-124-2, SOX1, TERT e LMX1A. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Realizou-se estudo transversal com coleta prospectiva de dados tendo sido incluídas mulheres com citologias previamente alteradas e que compareceram ao Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos para a realização de colposcopia. Imediatamente antes do exame colposcópico foram colhidas duas amostras de esfregaço cervical, uma para pesquisa de infecção pelo HPV e outra para determinação do perfil de hipermetilação dos genes hsa-miR-124-2, SOX1, TERT e LMX1A. Foram simuladas diferentes estratégias para a detecção de NIC2+ considerando o uso isolado ou em associação (coteste/reflexos) dos testes. Foram considerados para critério de comparação as taxas de sensibilidade, especificidade e criadas duas razões (NIC2+ e colposcopia). **RESULTADOS:** Foram incluídas no estudo 907 mulheres com idade entre 25 e 69 anos atendidas no período de 2014-2015 tendo sido simuladas 131 estratégias para detecção de NIC2+ as quais foram comparadas entre si e com dois modelos adotados como referência que previam como positivos os rastreios com citologias de ASC-H ou pior (ASC-H+) ou com HPV positivo. Considerando-se o uso de testes isolados obteve-se taxas de sensibilidade de 80,6% e 92,6% e especificidade de 79,6% e 61,6% para LIEBG+ e HPV+ respectivamente. A associação de citologia e HPV como cotestes considerando-se ASC-H+ ou HPV16/18+ obteve sensibilidade de 78,6 % e especificidade de 79,7%. Para modelos de testes sequenciais (reflexos) a triagem inicial com HPV e citologia reflexa (LIEBG+) apenas para os casos positivos para os tipos não 16/18 demonstrou 84,7% de sensibilidade e 79,1% de especificidade com aumento de 44% na demanda por colposcopias quando comparado ao rastreio com Papanicolaou (ASC-H+). Isoladamente a presença de hipermetilação do gene hsa-miR-12-2 apresentou maior sensibilidade (87,6%) que a citologia, considerando ASC-H+ ($p < 0,05$). Em relação ao uso do HPV+ isolado, a metilação do gene hsa-miR-124-2 tanto isoladamente ou como teste reflexo entre os casos positivos para os tipos não 16/18 de HPV, demonstrou menor sensibilidade, porém acima de 80% e com queda na demanda por colposcopia. **CONCLUSÃO:** para o uso isolado de citologia o parâmetro de LIEBG ou piores determinou aumento de sensibilidade com acréscimo de até 40% nas colposcopias. O uso de HPV no rastreio sem genotipagem como testes iniciais garantiu melhores taxas de sensibilidade. Houve melhora da especificidade entre as estratégias que definiram testes citológicos reflexos (ASC-US+) após HPV+ sem genotipagem e Papanicolaou (LIEBG+) entre

mulheres testadas positivamente para HPV dos tipos não 16/18. O gene hsa-miR-124-2 demonstrou melhor desempenho como marcador de lesões NIC2+ tanto isoladamente como em modelo de teste sequencial após HPV+ não 16/18.

PALAVRAS-CHAVE: Colo do Útero; Neoplasia Intraepitelial Cervical; Testes de DNA para Papilomavírus Humano; Metilação do DNA; Técnicas de Diagnóstico Molecular; Prevenção Secundária.

ABSTRACT

Possati-Resende JC. Detection of precursor lesions and cervical cancer based on combinations of cervical cytology, Human Papillomavirus research and gene methylation profile. **Thesis (Doctorate)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

BACKGROUND: Cervical cancer is an important public health problem, especially in developing countries, with high incidence and mortality rates. Despite the contribution of Pap smear tests, they present great variation in their sensitivity, which has stimulated the search for new options in screening strategies. Molecular tests for high-risk HPV research and more recently the presence of hypermethylation of some specific genes are markers that can improve the accuracy of models that currently employ Pap test alone. **AIMS:** To evaluate the performance of different strategies for detecting precursor lesions and cervical cancer through combinations between cytology, high-risk HPV and methylation profile of hsa-miR-124-2, SOX1, TERT and LMX1A genes. **MATERIAL AND METHODS:** A cross-sectional study was carried out with prospective data collection, including women with previously altered cytologies and who came to the Prevention Department of the Barretos Cancer Hospital for colposcopy. Immediately before the colposcopy, two cervical smear samples were taken, one for HPV and one for determining the hypermethylation profile of the hsa-miR-124-2, SOX1, TERT and LMX1A genes. Different strategies for the detection of CIN2+ were simulated considering the use alone or in association (coteste/reflexes) of the tests. Sensitivity, specificity rates were considered for comparison criteria and two reasons were created (CIN2+ and colposcopy). **RESULTS:** 907 women aged between 25 and 69 years attended in the period 2014-2015 were included in the study, having simulated 131 strategies for the detection of CIN2+ which were compared with each other and with two models adopted as reference that predicted the screening as positive with ASC-H cytologies or worse (ASC-H+) or with positive HPV. Considering the use of isolated tests, sensitivity rates of 80.6% and 92.6% and specificity of 79.6% and 61.6% for LSIL+ and HPV+ respectively were obtained. The association of cytology and HPV as cotestes considering ASC-H+ or HPV16/18+ obtained a sensitivity of 78.6% and specificity of 79.7%. For sequential test models (reflexes) the initial screening with HPV and reflex cytology (LSIL+) only for positive cases for types not 16/18 showed 84.7% sensitivity and 79.1% specificity with a 44% increase in the demand for colposcopies when compared to screening with Papanicolaou (ASC-H+). The presence of hypermethylation of the hsa-miR-124-2 gene alone showed greater sensitivity (87.6%) than cytology, considering ASC-H+ ($p < 0.05$). Regarding the use of HPV+ alone, methylation of the hsa-miR-124-2 gene either alone or as a reflex test among positive cases for non-16/18 types of HPV, showed less sensitivity, but above 80% and with drop in demand for colposcopy. **CONCLUSION:** for the isolated use of cytology, the LSIL parameter or worse determined an increase in sensitivity with an increase of up to 40% in colposcopies. The use of HPV in screening without genotyping as initial tests ensured better rates of sensitivity. There was an improvement in specificity between the strategies that defined reflex cytological tests (ASCUS+) after HPV+ without genotyping and Papanicolaou (LSIL+) among women tested positive for non-16/18 HPV types. The hsa-miR-124-2 gene demonstrated better performance as a marker of CIN2+ lesions both in isolation and in a sequential test model after HPV+ not 16/18.

KEYWORDS: Cervix Uteri, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Human Papillomavirus DNA Tests, DNA Methylation, Molecular Diagnostic Techniques, Secondary Prevention.

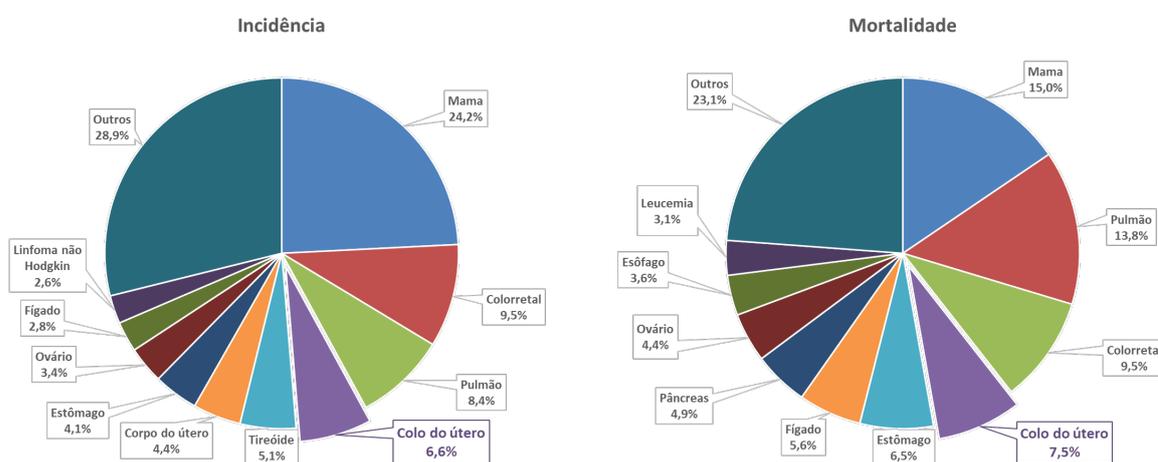


INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero constitui importante problema de saúde pública com impacto mundial, especialmente em regiões de baixa e média renda com altas taxas de incidência e mortalidade (Figura 1). Representa a quarta neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, sendo ainda hoje o câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres residentes em 28 países¹.



Fonte: modificado de Bray et al.¹

Figura 1 - Os gráficos apresentam os índices de incidência e mortalidade considerando-se os 10 tipos de cânceres mais comuns entre as mulheres para o ano de 2018 (os cânceres de pele não melanoma estão incluídos na categoria “outros”).

Levantamentos referentes ao ano de 2018 apontam que, em todo o mundo, são diagnosticados anualmente cerca de 570 mil casos novos de câncer do colo uterino sendo o mesmo responsável pela morte de aproximadamente 311 mil mulheres¹. Estima-se que até 2030 o número de casos de câncer do colo do útero no mundo aumente em quase 50%².

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontam para um número aproximado de 16.370 casos novos de câncer cervical para o biênio 2018-2019 entre as mulheres brasileiras, com um risco estimado de 15,43 casos para cada 100.000 mulheres.

Excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro mais incidente entre as mulheres brasileiras (Figura 2). Especificamente, quando se avalia as diferentes taxas de incidência regionais o câncer cervical é o mais incidente entre as mulheres da região Norte do Brasil, o segundo mais incidente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e ocupa ainda a quarta posição nas regiões Sul e Sudeste do país (Figura 3)³.

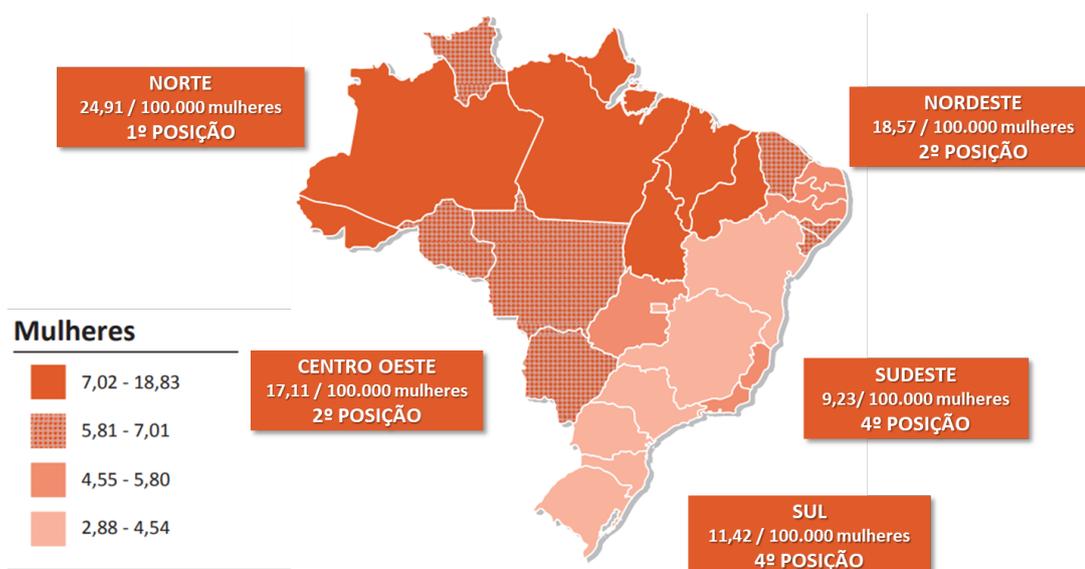
		Casos Novos	%
TIPOS DE CÂNCER - MULHERES	Mama	59.700	29,5%
	Colorretal	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%

Fonte: modificado de Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA)³

Figura 2 - Distribuição proporcional dos principais tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 para o sexo feminino, exceto pele não melanoma.

Para o Estado de São Paulo especificamente, o INCA estimou a ocorrência de cerca de 1.940 casos novos de câncer do colo do útero para o biênio 2018-2019 com taxa de incidência de 8,43 casos para cada grupo de 100.000 mulheres paulistas³.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as regiões do mundo que apresentam as mais elevadas taxas de incidência/mortalidade por câncer cervical são as regiões sul, ocidental e oriental do continente Africano além das porções sul e central do continente Asiático e da América do Sul².



Fonte: modificado de Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA)³

Figura 3 - Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres brasileiras, estimadas para o biênio 2018-19, segundo Unidade da Federação - Neoplasia Maligna do Colo do Útero.

No Brasil, a mortalidade decorrente do câncer cervical tem evidenciado tendência de estabilização ao longo das últimas décadas, entretanto, melhora significativa desse parâmetro não tem sido verificada o que se explica sobretudo pelo incremento no número de mortes por câncer do colo do útero nas regiões Norte e Nordeste do país⁴. Dados do Ministério da Saúde, que não raramente apresentam distorções devido à subnotificações e equívocos nos sistemas de informações sobre câncer, revelam taxa global de mortalidade ajustada por idade de 4,6/100 mil mulheres⁵ com pronunciadas discrepâncias entre as diferentes regiões do país.

Esses diferentes cenários de incidência e mortalidade verificados, seja no Brasil ou no restante do mundo, traduzem fundamentalmente a heterogeneidade nas condições socioeconômicas das populações, com disparidades acentuadas no acesso à programas de rastreamento de qualidade e adequado manejo das mulheres com testes diagnósticos alterados⁶. Invariavelmente verificam-se maiores taxas de mortalidade em regiões com pronunciadas desigualdades sociais e menores níveis de desenvolvimento. No Brasil, os indicadores também obedecem a essa tendência⁷.

1.2 História natural do câncer do colo do útero

A história natural do desenvolvimento do câncer do colo uterino está intimamente associada à infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) dos tipos carcinogênicos a qual representa a infecção sexualmente transmissível (IST) mais prevalente no mundo⁸. A infecção pelo HPV ocorre mais frequentemente entre indivíduos jovens, com vida sexual ativa, múltiplos parceiros sexuais e atinge pico de incidência poucos anos após o início da atividade sexual⁹.

Extensa revisão publicada em 2010 e baseada em estudos divulgados entre 1995 e 2009 estimou uma prevalência global de 11,7% de infecção pelo HPV entre mulheres de todas as idades com citologia cervical normal, verificando-se taxas mais elevadas nas regiões da África Subsaariana (24%), Europa Oriental (21,4%) e América Latina (16,1%)¹⁰.

Os dados estatísticos referentes à incidência e prevalência da infecção pelo HPV no Brasil não apresentam representação uniforme nas diferentes regiões do país e habitualmente baseiam-se em análises transversais de pacientes com alterações citológicas identificadas em testes de rastreio.

Estudo de revisão publicado em 2010 demonstrou prevalência global de infecção pelo HPV variando entre 13,7% e 54,3%. Ao se considerar apenas as mulheres com citologia cervical normal verificou-se taxas de 10,4% a 24,5% de prevalência¹¹.

Levantamento utilizando-se de teste molecular para identificação de DNA viral (*Qiagen careHPV® test*) aplicado em 2000 mulheres rastreadas para câncer cervical pelo Hospital de Câncer de Barretos demonstrou 12,3% de positividade para HPV de alto risco oncogênico (HPV-AR) independentemente do resultado do teste de Papanicolaou¹². Outro estudo recente que englobou mulheres atendidas por serviços públicos de saúde do Estado de São Paulo identificou taxa de 14,9% de positividade para HPV-AR em população com média de idade de 42 anos¹³.

Cerca de 40 tipos de HPV são capazes de infectar as células epiteliais do trato genital. De acordo com o genótipo e as alterações celulares induzidas pela incorporação do material genético viral ao genoma da célula hospedeira, aproximadamente 15 tipos de HPV são

classificados como de alto risco sendo responsáveis pela quase totalidade dos casos de câncer do colo do útero¹⁴.

Importa ressaltar o fato de que os mecanismos implicados na carcinogênese do câncer cervical invariavelmente dependem do dano genético causado pelo vírus ao DNA celular e que esse processo se dá de forma lenta e progressiva. Múltiplos e variáveis fatores associados à virulência do HPV e à resposta imune do hospedeiro irão determinar o surgimento ou não de lesões teciduais e a gravidade dessas lesões.

Para a maioria das mulheres, sobretudo entre as mais jovens, a infecção pelo HPV rotineiramente apresenta caráter transitório¹⁵ com regressão espontânea em um período que varia de poucas semanas a até 24 meses sem o desenvolvimento de lesões epiteliais significativas. Mesmo entre as mulheres que chegam a desenvolver as chamadas lesões intraepiteliais precursoras (NIC2/3), cerca de 26% delas também sofrerão regressão espontânea completa em até 15 semanas após estabelecido o diagnóstico¹⁶.

1.3 Emprego do teste de Papanicolaou no rastreamento do câncer cervical

Os programas de rastreamento do câncer cervical, rotineiramente baseados na realização de testes citológicos (Papanicolaou), foram responsáveis por uma substancial redução do ônus desse tipo de neoplasia nos países desenvolvidos nas últimas décadas¹⁷⁻¹⁹.

Em grande parte, esses resultados se devem às estratégias de detecção precoce baseadas em programas organizados, com altas taxas de cobertura populacional, avaliação sistemática das mulheres com testes positivos e eficiência no acompanhamento e tratamento das pacientes com lesões precursoras o que impactou positivamente para a redução das taxas de morbimortalidade, sobretudo na Europa, América do Norte, Japão, Austrália e Nova Zelândia¹⁸.

Levantamentos prévios estimam que o rastreamento adequadamente realizado entre mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos por meio do teste de Papanicolaou possa reduzir em cerca de 80% a mortalidade determinada pela doença e em 90% a incidência de câncer do colo do útero²⁰.

No Brasil especificamente, o programa de rastreamento de câncer do colo do útero baseia-se no emprego de testes citológicos convencionais ofertados em modelo fundamentalmente oportunístico que prioriza mulheres na faixa etária dos 25 aos 64 anos de idade. As Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (2016)²¹ preconizam a realização de dois exames de Papanicolaou com intervalo de um ano e após dois resultados negativos considerar intervalos trienais (Figura 4).

Rastreio Populacional no Brasil – Câncer do Colo do Útero

método de rastreamento Exame Citopatológico - Papanicolaou

população-alvo Início aos 25 anos de idade para mulheres que já tiveram ou têm atividade sexual. Interromper aos 64 anos após 2 exames negativos

periodicidade Os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual e, se ambos os resultados forem negativos, os próximos devem ser realizados a cada 3 anos

Fonte: modificado de Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA)³

Figura 4 – Critérios estabelecidos pelas diretrizes brasileiras para o rastreamento populacional do câncer do colo do útero.

Apesar da inquestionável contribuição dos exames citológicos no rastreio populacional, estes apresentam grande variação na sua sensibilidade e especificidade em detectar lesões neoplásicas cervicais. Em diversas revisões, a sensibilidade da citologia em diagnosticar lesões de alto grau (LIEAG) variou de 47% a 62%, e a especificidade de 60% a 96,8%²²⁻²⁴. Estimam-se, ainda, taxas entre 5% e 20% de testes falso-negativos na população geral²⁵, sendo que aproximadamente 30% das pacientes diagnosticadas com câncer cervical apresentaram pelo menos um Papanicolaou anterior com resultado falso-negativo²⁶.

Vários são os fatores que podem interferir para a ocorrência não desprezível de resultados falso-negativos advindos dos testes de Papanicolaou estando associados a

equivocos na coleta do material com amostragem celular inadequada e conseqüente não representação da zona de transformação do colo uterino, problemas relacionados ao preparo das lâminas e sobretudo, aos erros de análise e interpretação da morfologia celular do esfregaço cervical.

Além disso, muitas dessas limitações atribuídas ao exame de Papanicolaou estão associadas a critérios de classificação de reprodutibilidade variável que interferem no desempenho do método. Essas limitações são representadas por exemplo, pela presença de achados classificados genericamente como “atípias de significado indeterminado”, cujo grau de imprecisão é significativo mesmo entre observadores experientes²⁷.

Por volta dos anos de 1990 houve o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de citologia com fixação celular em meio líquido que buscavam aprimorar o teste de Papanicolaou. Objetivando diminuir os fatores de obscurecimento dos esfregaços cervicais e garantir maior qualidade no processo de fixação celular, a citologia em meio líquido tem substituído os exames convencionais em muitos programas de rastreamento populacional de câncer do colo uterino sobretudo nos países desenvolvidos²⁸.

Quando empenhadas em condições adequadas de qualidade há similaridade no desempenho da citologia em meio líquido e da citologia convencional no diagnóstico de NIC de alto grau ou pior (NIC2+)²⁹. Contudo, já comprovação da superioridade da citologia em meio líquido quando se avalia fatores como a uniformização dos procedimentos de coleta, preservação da morfologia celular pela imediata fixação em meio líquido, menor número de artefatos e fatores de obscurecimento e melhor qualidade do esfregaço para análise com conseqüente redução na quantidade de amostras insatisfatórias³⁰⁻³².

Contudo, um dos maiores benefícios da citologia em meio líquido está na possibilidade da realização de exames complementares, como por exemplo, a pesquisa do HPV, testes imunocitoquímicos e outras pesquisas genéticas. Isto sem contar com a possibilidade do aumento da produtividade em termos de número de lâminas examinadas por período considerando-se o emprego de automação nesse processo (leitura guiada automatizada). Biscotti et al. demonstraram um aumento médio de produtividade dos citotécnicos na ordem de duas vezes com o processo de automação associado à citologia em meio líquido³³.

1.4 Teste de HPV no rastreamento do câncer cervical

Diferentes estudos de base populacional que avaliam o papel dos testes para detecção dos HPV de alto risco no rastreamento primário do câncer cervical têm demonstrado aumento significativo da sensibilidade quando comparados à utilização da citologia de esfregaço cervical, além de serem superiores em termos de reprodutibilidade³⁴. Acrescenta-se ainda o fato que os requisitos necessários para a amostragem cervical são bem menos críticos do que no exame de citologia cervical.

Alguns estudos europeus e norte-americanos de rastreamento evidenciam taxas de sensibilidade em média 37% maiores na detecção de NIC2+ pelos testes de HPV quando comparado à citologia³⁵ adicionalmente, quando negativos, os testes de HPV conferem alto valor protetor contra o desenvolvimento de lesões NIC3+³⁶. Habitualmente as pesquisas reforçam as vantagens dos testes de HPV para o rastreamento populacional de câncer cervical particularmente entre as mulheres com mais de 30 anos de idade^{37, 38}.

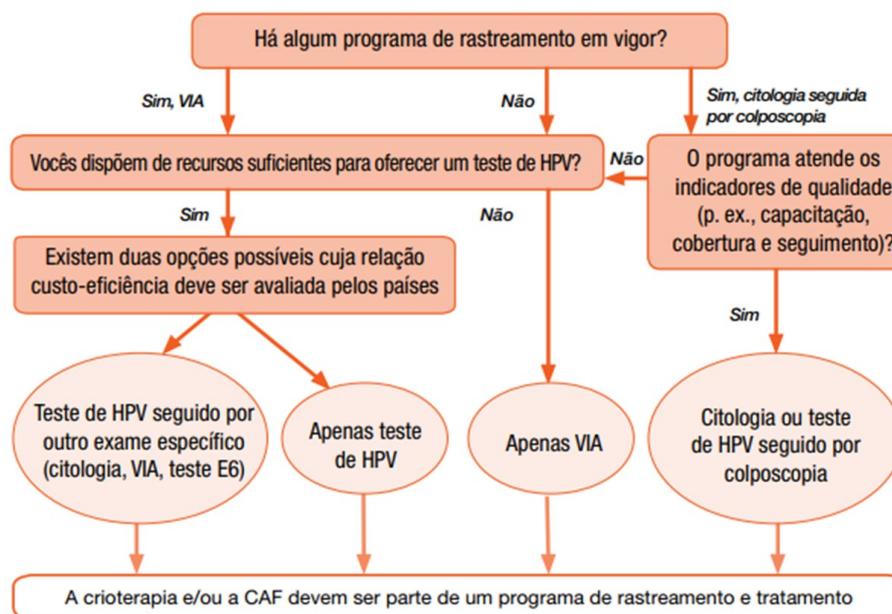
Por outro lado, a despeito das claras vantagens apontadas, há limitações relacionadas à baixa especificidade dos testes para pesquisa de HPV-AR^{39, 40}, sobretudo entre mulheres mais jovens abaixo dos 30 anos. Essa característica contribuiria para uma elevação na demanda de pacientes encaminhadas para colposcopia o que contribuiria para sobrecarga sobre os serviços de investigação complementar. Wright et al. demonstraram, avaliando os dados do estudo ATHENA, maior necessidade de exames colposcópicos para a identificação de lesões NIC2+ entre mulheres rastreadas primariamente pelos testes de HPV em relação ao grupo rastreado por citologia cervical⁴¹.

Outro fator importante que deve ser considerado é que comparativamente ao exame citológico, o teste para HPV possui custo mais elevado o que representa uma barreira considerável a sua implantação em países com baixo e médio nível socioeconômico, justamente onde o rastreamento do câncer do colo do útero se faz mais necessário e impactante³⁴.

A associação de dois métodos, um com alta sensibilidade (teste molecular do HPV) e outro com alta especificidade (exame citológico) parece representar uma opção interessante para o rastreamento das lesões precursoras e câncer cervical. A US Preventive Services Task

Force recentemente reforçou a utilização do HPV nas suas diretrizes para detecção precoce do câncer do colo do útero. De acordo com essa recomendação, mulheres com idade entre 30 e 65 anos devem ser submetidas a pesquisa molecular de HPV isoladamente ou em associação a citologia cervical a cada 5 anos⁴².

A própria OMS recomenda o emprego dos testes de HPV isolados ou seguidos de outros testes mais específicos (VIA, citologia ou E6) em cenários de países que não possuem programas de rastreamento em vigor. Além disso, os programas que utilizem o modelo tradicional de citologia com investigação complementar por colposcopia mas que não consigam atender a todos os indicadores de qualidade também deveriam considerar o emprego de modelos baseados em testes de HPV caso haja previsão suficiente de recursos financeiros (Figura 5)⁴³.



Fonte: modificado de WHO Guidelines for Screening and Treatment⁴³

Figura 5 – Fluxograma de tomada de decisão para gerenciamento de programas de rastreio de câncer do colo do útero.

HPV: Papilomavírus Humano; VIA: inspeção visual após aplicação de solução de ácido acético; E6: proteína oncogênica do Papilomavírus Humano.

O HPV, além do rastreio primário, pode ainda ser empregado na triagem de mulheres com exames citológicos classificados como ASC-US. Essa indicação tem sido empregada em

vários países, sobretudo na América do Norte⁴⁴ e Europa onde os protocolos de rastreamento indicam sua realização em amostras residuais da citologia em meio líquido (modelos baseados em testes sequenciais). O ASC-US / LIEBG Triage Study demonstrou que mulheres com resultados de ASC-US e teste negativo para HPV-AR apresentam risco muito baixo para LIEAG com alto valor preditivo negativo⁴⁵.

Vários testes podem ser utilizados para a pesquisa do HPV-AR na triagem de mulheres com colpocitologia de ASC-US, sendo o teste de captura híbrida II (HC2) (*Qiagen, Gaithersburg, MD, EUA*) um dos mais difundidos, baseando-se em sondas específicas de RNA para 13 diferentes tipos de HPV de alto risco oncogênico e 5 tipos de HPV de baixo risco. O resultado da HC2 sinaliza a amostra analisada como positiva ou negativa e indica se o tipo viral pertence ao grupo dos HPV-AR ou HPV-BR, não detalhando o tipo viral específico.

Nas últimas décadas, vários novos testes têm sido apresentados como instrumentos de pesquisa molecular para detecção de DNA-HPV em amostras cervicais com diferentes indicações de uso seja para programas de rastreio populacional ou para o manejo clínico de pacientes com exames citológicos alterados e controle pós tratamento de lesões intra-epiteliais de alto grau induzidas pelo Papilomavírus Humano.

Dentre eles, o *Cobas 4800 test*[®] (*Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada*) que possibilita a detecção de 14 tipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) tem sido alvo de inúmeros estudos que têm validado sua utilização na triagem de mulheres com Papanicolaou alterado ou no rastreio primário do câncer cervical.

Ressalta-se, em relação ao *Cobas 4800*[®], potencial vantagem por identificar isoladamente os genótipos HPV-16 e HPV-18 os quais, segundo diversos levantamentos, estão associados à cerca de 70% dos casos de neoplasias cervicais invasivas⁴⁶. Casuística publicada em 2013 identificou a presença de HPV-16 e/ou HPV-18 em 90% dos casos de câncer cervical entre mulheres brasileiras atendidas em dois grandes centros de referência, o que reafirma a importância do papel desses tipos virais no mecanismo de carcinogênese⁴⁷.

Estudos comparando o desempenho do teste de captura híbrida II (HC2) com o teste *Cobas 4800*[®] não têm evidenciado diferenças significativas na acurácia de ambos os métodos⁴⁸⁻⁵². Lapiere et al. demonstraram taxas de sensibilidade e especificidade de 89,7%

e 66,7%, respectivamente para o Cobas 4800® e de 93,1% e 72,2% para a HC2 na identificação de mulheres com lesões NIC2+⁴⁸.

White C et al. verificaram índices semelhantes no emprego do Cobas 4800® para a detecção de lesões NIC2+ em mulheres com citologia de ASC-US com taxas de sensibilidade e especificidade de 81% e 63,3% respectivamente. Adicionalmente, nesse mesmo trabalho evidenciou-se 86% de sensibilidade e 55,2% de especificidade na detecção de lesões NIC2+ em mulheres com Papanicolaou categorizado com LIEBG⁵⁰. Outra pesquisa, conduzida por Cuzick J. et al. avaliou o desempenho do Cobas 4800® na detecção de NIC2+ comparado a outros cinco testes empregados na pesquisa de DNA ou RNA viral em amostras de citologia em meio líquido. Comparativamente aos demais testes, o Cobas 4800® forneceu taxas maiores de sensibilidade e especificidade³⁹.

Além de todas as vantagens já mencionadas do teste para HPV em relação ao exame citopatológico, outro aspecto relevante é a possibilidade de utilização de amostras auto coletadas pelas mulheres, inclusive em ambiente domiciliar, para realização dos testes moleculares o que promoveria, pelo menos em teoria, o aumento das taxas de cobertura dos programas de rastreamento com especial contribuição entre as usuárias não aderentes aos testes convencionais⁵³. Revisão publicada em 2014 demonstrou que a detecção de infecção viral pelo HPV realizada em amostras de secreção vaginal auto coletadas apresenta desempenho inferior aos testes coletados por clínicos no rastreio de lesões NIC2+. Porém, com índices de sensibilidade de 76% no rastreio de lesões NIC2+ e de 84% na detecção de NIC3 ou pior, os testes de autocoleta devem ser considerados como estratégia adicional entre grupos resistentes⁵⁴.

1.5 Eventos epigenéticos – metilação do DNA

A epigenética correlaciona-se a alterações na expressão dos genes sem que haja modificações na sequência de bases do DNA. Tais alterações podem ocorrer nas proteínas histonas por meio de microRNAs ou na própria molécula de DNA. Entre as histonas pode-se verificar processos de fosforilação, acetilação ou metilação, enquanto na molécula de DNA apenas a metilação.

A metilação constitui um dos processos que mais influencia o mecanismo da carcinogênese e a progressão tumoral⁵⁵. Os eventos de metilação do DNA e modificações nas proteínas histonas são passos importantes para definir a programação correta da expressão dos genes e erros nestes processos podem levar à expressão aberrante de genes e à perda de pontos importantes de checagem anticâncer^{56, 57}. Esses eventos são capazes de regular a taxa de transcrição dos genes por meio da acessibilidade às regiões regulatórias do DNA.

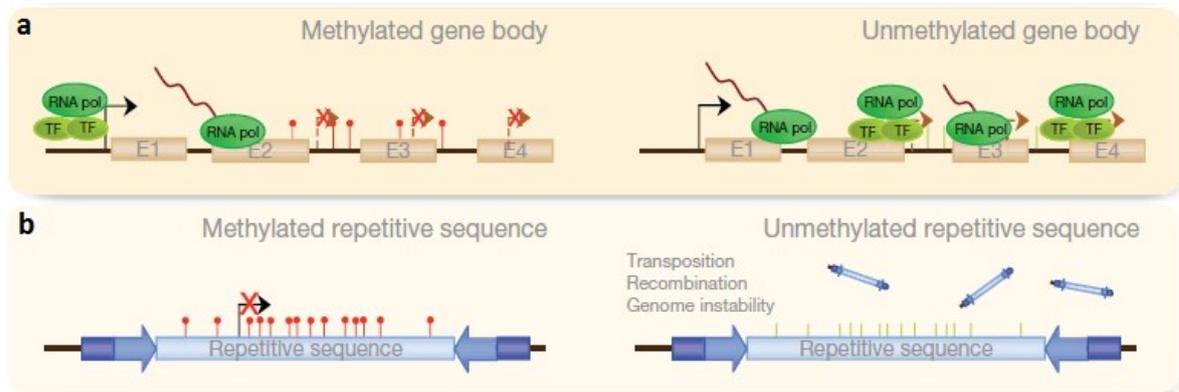
A metilação baseia-se na modificação covalente do DNA em que um radical metil (CH₃), doado por uma S-adenosilmetionina é transferido para o carbono 5 de uma citosina que precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), através da ação de uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT). Existem aproximadamente 28 milhões de sítios CpG no genoma e cerca de 60 a 80% deles encontram-se metilados.

O processo de metilação pode ocorrer em diferentes regiões do genoma, como aquelas que são ricas em dinucleotídeos CpG (a letra “p” representa a ligação fosfodiéster entre os dois nucleotídeos), chamadas de ilhas CpG, que estão localizadas nas regiões promotoras de 60% dos genes e em suas proximidades. Quando as ilhas CpG de uma região promotora encontram-se não metiladas ou hipometiladas, ocorre a ligação dos fatores de transcrição e o gene é expresso. Quando essas regiões se apresentam hipermetiladas a presença de radicais metil e de DNMT impede que os fatores de transcrição se liguem e o gene pode ser silenciado. O mesmo ocorre nas ilhas CpG que estão próximas às regiões promotoras, cerca de 2kb acima delas⁵⁸⁻⁶².

Em uma situação normal, cerca de 10 a 15% destas ilhas apresentam-se metiladas e são diretamente responsáveis pela regulação da expressão gênica e da diferenciação celular, na embriogênese, na inativação do cromossomo X, no imprinting genômico e no aparecimento do câncer⁵⁵. Os outros 85 a 90% das ilhas CpG do genoma humano encontram-se não metiladas e estão envolvidas, principalmente, com a expressão tecido-específica, estando presentes nas regiões promotoras dos genes supressores tumorais que, ao contrário dos proto-oncogenes, inibem o crescimento e a divisão celular^{57, 59, 62}.

A metilação também pode ocorrer em dinucleotídeos CpG isolados localizados no corpo dos genes e em sequências repetitivas do genoma. Estes dinucleotídeos, em situações normais, encontram-se metilados e estão envolvidos no silenciamento de elementos

repetitivos do genoma e no controle da instabilidade genômica^{59, 62}, assim, em uma célula saudável, espera-se encontrar uma hipermetilação global do DNA (Figura 6).



Fonte: Reproduzido de Portela & Esteller⁶².

Figura 6 - Metilação em dinucleotídeos CpG isolados no corpo do gene e em sequências repetitivas.

(a) No corpo dos genes, em uma célula normal, os sítios CpG isolados apresentam-se metilados, contribuindo para o funcionamento ideal desta. Fatores internos e externos à célula ou ao organismo podem contribuir para que ocorra uma hipometilação global nesses sítios isolados, podendo levar ao aparecimento de doenças complexas, como o câncer. (b) Em uma célula normal, as sequências repetitivas do DNA apresentam-se metiladas, se o contrário ocorrer, ou seja, elas apresentarem-se não metiladas, podem ocorrer eventos, como transposição, recombinação gênica e instabilidade cromossômica, que irão prejudicar o funcionamento celular.

RNA pol: RNA Polimerase; TF: Fator de Transcrição; E1/E2/E3/E4: Exon.

A metilação em ilhas 5'CpG na região promotora de genes emergiu como um dos mais importantes mecanismos epigenéticos para o desenvolvimento de cânceres humanos⁶³. Além disso, mudanças nos padrões de metilação do DNA são bem estudadas em câncer e uma redução global de metilação do DNA e hipermetilação gene específica, sobretudo em genes supressores tumorais, tem sido descrita como uma característica marcante de diferentes tipos de cânceres^{63, 64}.

Sabe-se que este mecanismo também pode alterar padrões de expressão gênica^{64, 65} e estudos recentes têm demonstrado que a metilação do DNA também pode ser alterada rapidamente em resposta a fatores ambientais. Dessa forma, a hipermetilação em genes supressores tumorais é amplamente caracterizada por representar um dos primeiros passos envolvidos na carcinogênese humana⁶⁶.

Tratando-se especificamente dos genes supressores tumorais, observou-se que em uma célula normal, as ilhas CpG da região promotora de um gene supressor tumoral não estão metiladas, ao contrário dos CpG isolados no corpo do gene e em suas sequências repetitivas, que também são regiões regulatórias da expressão. Essa conformação permite que o gene seja transcrito e desempenhe corretamente suas funções na célula. Já em uma célula tumoral ocorre o oposto. A hipermetilação das ilhas CpG da região promotora impedem que ocorra a transcrição e o genoma apresenta uma hipometilação global. Esses fatores associados provocam o silenciamento do gene e favorecem o aparecimento do tumor, tornando a metilação uns dos principais eventos precoces na carcinogênese⁶⁷⁻⁷⁰.

Alguns estudos têm evidenciado que o perfil de metilação do DNA em regiões promotoras de alguns genes supressores tumorais, nas células infectadas pelo HPV, mostra-se alterado em lesões mais graves causadas pelo vírus, como em lesões precursoras. A análise do perfil de metilação representa novo método promissor para a detecção de lesões induzidas pelo HPV⁷¹⁻⁷³, já que a literatura vem demonstrando distinção no perfil de metilação de genes específicos em lesões precursoras do câncer do colo do útero^{71, 74 75}.

Em 2009, a revisão sistemática de Wentzensen et al.⁷¹ mostrou alta frequência de metilação em NIC de alto grau, com destaque para os seguintes genes: HIC1 (59%), APC (34%), CADM1 (33%), CDH1 (29%), DAPK1 (29%) e TERT (29%)⁷⁴. Além destes, atualmente existe uma coleção de proto-oncogenes e genes supressores tumorais descritos na literatura como responsáveis pelo desenvolvimento do câncer do colo do útero^{69, 72, 73, 75-77}.

Os principais genes supressores tumorais listados na literatura estão resumidos na figura 7 e estão envolvidos nas principais funções que podem promover o aparecimento e progressão do câncer, em especial do colo do útero. Assim, é possível concluir que a hipermetilação dos genes supressores tumorais está provavelmente envolvida com o processo de carcinogênese no colo uterino, representado potencial biomarcador para a presença do câncer e de suas lesões precursoras até mesmo nos estágios mais iniciais^{55, 78}.

Evidências do papel da hipermetilação na carcinogênese cervical também foram verificadas em estudo publicado por grupo de pesquisadores do Hospital de Câncer de Barretos que demonstrou que a hipermetilação dos genes hsa-miR-124-2, SOX1, TERT e LMX1A pode constituir biomarcadores promissores para detecção de lesões precursoras no câncer do colo do útero independentemente do status da infecção pelo HPV⁷⁹.

<i>APC</i>	<i>C15ORF48</i>	<i>LKL10</i>	<i>P14</i>	<i>SOCS3</i>
<i>ASC</i>	<i>DAPK1</i>	<i>LHFPL4</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>SOX1</i>
<i>BRCA1</i>	<i>DcR1</i>	<i>LMX1A</i>	<i>RARB</i>	<i>SPARK</i>
<i>BRCA2</i>	<i>DcR2</i>	<i>LRRC3B</i>	<i>RB1</i>	<i>SYK</i>
<i>CADM1</i>	<i>DLC1</i>	<i>MAL</i>	<i>ROBO1</i>	<i>TERT</i>
<i>CAGE</i>	<i>DPYS</i>	<i>MDR1</i>	<i>ROBO3</i>	<i>TFP12</i>
<i>CALCA</i>	<i>EDNRB</i>	<i>MGMT</i>	<i>RRAD</i>	<i>THBS1</i>
<i>CAV1</i>	<i>ESR1</i>	<i>ML1</i>	<i>RPRM</i>	<i>TIMP2</i>
<i>CCNA1</i>	<i>EPB41L3</i>	<i>MTIG</i>	<i>RUNX3</i>	<i>TIMP3</i>
<i>CCND2</i>	<i>FANCF</i>	<i>MYOD1</i>	<i>SCGB3A1</i>	<i>TNFRSF10</i>
<i>CDH1</i>	<i>FHIT</i>	<i>NKX6-1</i>	<i>SFN</i>	<i>TP73</i>
<i>CDH13</i>	<i>GSTP1</i>	<i>NOL4</i>	<i>SFRP1</i>	<i>TWIST1</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>HIC1</i>	<i>PAX1</i>	<i>SLIT1</i>	<i>VHL</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>HLTF</i>	<i>PGR</i>	<i>SLIT2</i>	<i>ZMYND10</i>
<i>CHFR</i>	<i>hsa-miR-124-2</i>	<i>POU2F3</i>	<i>SLIT3</i>	
<i>COX2</i>	<i>HSPA2</i>	<i>PRDM2</i>	<i>SNCG</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>HS3ST2</i>	<i>PTEN</i>	<i>SOCS1</i>	
<i>C13ORF18</i>	<i>JAM3</i>	<i>PTGS2</i>	<i>SOCS2</i>	

Fonte: Adaptado de Lorincz et al.⁵⁵

Figura 7 - Genes candidatos a biomarcadores diagnósticos de metilação do DNA para o câncer do colo do útero.

Diante nas evidências da possibilidade dos testes que detectam a hipermetilação em diferentes genes, impõem-se o desafio de estabelecer possíveis estratégias de detecção de lesões precursoras e câncer cervical utilizando-se a metilação de genes e transpor para a prática clínica a utilização de testes epigenéticos na rotina do rastreamento populacional.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de diferentes estratégias para detecção de lesões precursoras e câncer cervical por meio de combinações entre citologia, pesquisa do HPV de alto risco e perfil de metilação de genes hsa-miR-124-2, SOX1, TERT e LMX1A.

2.2 Objetivos Específicos

A) Avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes supracitados para a detecção de NIC2+ em modelos que simulem os testes isoladamente, em paralelo (coteste) ou de forma sequencial (testes reflexos).

B) Quantificar o impacto das diferentes estratégias simuladas na demanda por exames de colposcopia e comparar os diferentes modelos por meio do cálculo da razão de colposcopia.

C) Definir e comparar a acurácia das estratégias simuladas com os modelos convencionais que preveem o uso de citologia isolada (ASC-H+) ou teste de HPV de alto risco isolado (HPV+).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado estudo transversal com coleta prospectiva de dados desenvolvido nos Departamentos de Prevenção, Laboratório de Anatomia Patológica e Centro de Pesquisa em Biologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) – Fundação Pio XII, Barretos – SP.

3.2 População do estudo

Foram incluídas no estudo mulheres com idade entre 25 e 69 anos atendidas no Ambulatório de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII e que se submeteram a colposcopia entre janeiro de 2014 e maio de 2015 em virtude de exame citológico de rastreamento alterado classificado de acordo com os critérios estabelecidos pela revisão do Sistema Bethesda em 2001⁸⁰.

Os critérios estabelecidos para a inclusão das pacientes no estudo foram:

- 1) Comparecimento ao Departamento de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos para realização de colposcopia;
- 2) Presença de colo uterino durante o exame colposcópico;
- 3) Ausência de histórico de câncer cervical tratado;
- 4) Não gestantes ou nutrizes;
- 5) Assinatura do Termo de Consentimento depois de prestados os devidos esclarecimentos.

Os critérios estabelecidos para a exclusão das pacientes no estudo foram:

- 1) Mulheres com lesões cervicais macroscopicamente invasivas durante a avaliação colposcópica;
- 2) Casos com junção escamo-colunar (JEC) não totalmente visível e que não foram submetidas à coleta de biópsia cervical;
- 3) Casos com alterações identificadas durante a colposcopia não biopsiados;
- 4) Mulheres que não tiveram amostras cérvico-vaginais testadas para HPV;
- 5) Mulheres com testes moleculares inválidos para os três grupos de HPV;
- 6) Mulheres com amostras citológicas classificadas como insatisfatórias;
- 7) Mulheres submetidas a biópsias cervicais, porém com material insuficiente para conclusão diagnóstica;
- 8) Mulheres com resultado alterado (\geq ASC-US) na citologia coletada durante a colposcopia e que não tenham sido submetidas à biópsia cervical;
- 9) Mulheres com diagnóstico de doença neoplásica ginecológica primária não cervical.

Na Figura 8 estão demonstrados os critérios de inclusão e exclusão.

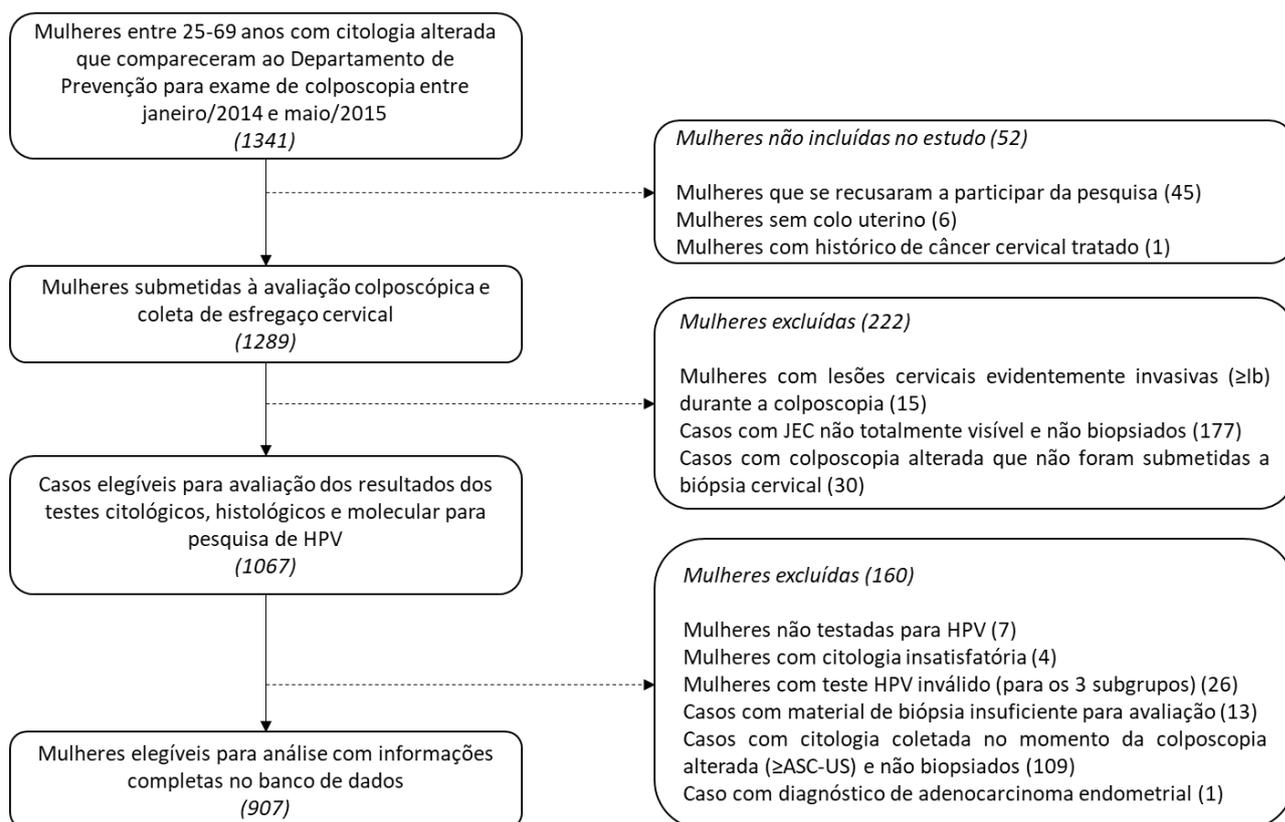


Figura 8 - Diagrama representativo das mulheres incluídas no estudo de acordo com os critérios dos exames colposcópico, citológico, histológico e molecular para pesquisa de HPV.

JEC: junção escamo-colunar; HPV: Papilomavírus Humano; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas.

3.3 Metodologia

As pacientes participantes do estudo foram selecionadas entre as mulheres que realizaram exame de colpocitologia oncótica para rastreamento de câncer cervical ofertado pelo serviço de rastreamento do HCB (coletadas em unidades móveis de atendimento ou na própria sede do Departamento de Prevenção de Câncer) e também as mulheres que realizaram os testes de rastreio em unidades públicas de saúde de municípios que mantem convênio com o Laboratório de Citopatologia do HCB para escrutínio das citologias e investigação complementar dos casos suspeitos.

Procedeu-se à convocação das pacientes para realização de exame colposcópico no Ambulatório de Colposcopia do Departamento de Prevenção do HCB por meio de busca ativa utilizando-se de correspondências eletrônica (e-mail), correspondência enviada pelos

correios e contato telefônico (obedecendo-se aos protocolos e estratégias já rotineiramente utilizadas no Departamento de Prevenção)⁸¹.

Ao comparecerem ao Ambulatório de Colposcopia as mulheres eram abordadas ainda durante a espera para a consulta e, após o esclarecimento dos objetivos e eventuais dúvidas, as pacientes que obedeciam aos critérios de inclusão e consentiam em participar da pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

3.3.1 Coleta de material biológico e exame colposcópico

Imediatamente antes da colposcopia, realizaram-se duas novas coletas de material (escovado cervical) utilizando-se de dispositivos de conservação em meio líquido. A primeira amostra, que já é rotineiramente realizada no serviço, foi destinada aos exames de citologia cervical e teste molecular para pesquisa de DNA-HPV de alto risco, sendo a escova (*Cervex-Brush Combi*[®] - *Rovers Medical Devices*) armazenada no meio *SurePath*[®] *Preservative Fluid* (Becton & Dickinson, EUA).

A segunda amostra foi coletada por escova *Cervex-Brush*[®] (*Rovers Medical Devices*) destinou-se aos testes de metilação tendo-se utilizado o meio *ThinPrep*[®] *PreservCyt Solution* (Hologic, EUA) (Figura 9). A pesquisa para identificação de hipermetilação foi realizada para um subgrupo das pacientes incluídas sendo os critérios de seleção descritos mais adiante. Todos os resultados de exames reportados no estudo referem-se a essas amostras coletadas durante o exame colposcópico.

Cabe ressaltar que as citologias cervicais coletadas pelo serviço de Prevenção do Hospital de Câncer de Barretos são realizadas rotineiramente em meio líquido (*SurePath*[®]). Os frascos com as amostras em meio líquido ficaram armazenados em ambiente refrigerado para as pesquisas de HPV e metilação. Após a utilização, o material biológico remanescente nos frascos de *SurePath*[®] e *ThinPrep*[®] foi encaminhado para armazenamento no biobanco do HCB para, quando necessário, serem utilizados em futuras análises moleculares.

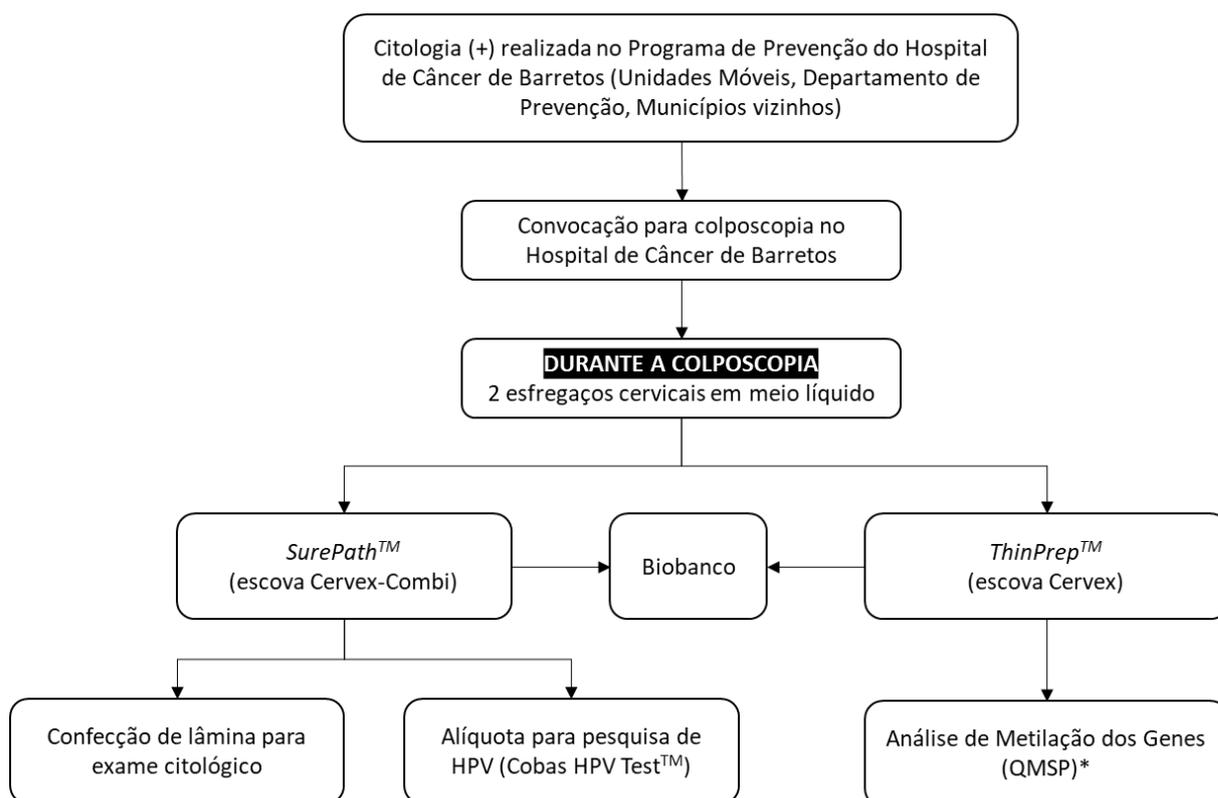


Figura 9 – Fluxograma de trabalho e distribuição das amostras biológicas no estudo.

QMSP: Quantitative Methylation Specific PCR; HPV: Papilomavírus Humano

(*) subgrupo das mulheres incluídas no estudo teve suas amostras testadas para pesquisa de metilação do DNA.

Todos os exames de colposcopia (com ou sem biópsia cervical) e coleta dos esfregaços cervicais foram realizados por dois experientes colposcopistas do HCB que tinham conhecimento prévio dos laudos citológicos alterados que definiram a necessidade de procedimentos diagnósticos adicionais.

A classificação da colposcopia baseou-se na nomenclatura estipulada pela *International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy* – Rio de Janeiro, 2011⁸². A avaliação histológica, quando indicada, foi realizada por meio de amostras obtidas por biópsias com pinça saca-bocado (um ou mais fragmentos) ou por meio de curetagem endocervical (CE) nos casos com alterações visíveis que atingissem ou penetrassem o canal cervical. A obtenção de espécime do canal endocervical, quando necessária, foi realizada utilizando-se instrumental adequado (cureta endocervical) orientando-se como padrão a realização do raspado em toda circunferência do canal endocervical.

Apenas as mulheres com achados colposcópicos suspeitos para lesão intraepitelial ou câncer foram submetidas à coleta de amostra tecidual para exame anatomopatológico. Os casos com lesões visíveis, mas que por diferentes motivos não tenham sido biopsiados durante a colposcopia, foram excluídos do estudo. Os motivos para a não realização de biópsias durante a colposcopia mesmo com exames alterados são: (a) mulheres jovens com achados colposcópicos menores e (b) pacientes em seguimento clínico com diagnóstico de lesão intraepitelial de baixo grau já estabelecido previamente.

De acordo com a visibilidade da junção escamo-colunar (JEC) (totalmente visível ou não) associada aos achados colposcópicos, a realização de biópsia cervical (por pinça saca-bocado e/ou cureta endocervical) e ao resultado do exame citológico definiu-se critérios combinados para o status diagnóstico (padrão-ouro) conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios combinados para definição de status diagnóstico baseado na visibilidade da JEC, achados colposcópicos, biópsia e citologia cervical.

<i>Visibilidade JEC</i>	<i>Colposcopia</i>	<i>Biópsia Cervical e/ou CE</i>	<i>Citologia Cervical</i>	<i>Status Diagnóstico</i>
Totalmente visível	Sem alterações	Não realizada	Negativa	<i>Sem doença</i>
Totalmente visível	Sem alterações	Não realizada	ASC-US+	<i>Indefinido (excluído)</i>
Totalmente visível	Alterada	Não realizada	Indiferente	<i>Indefinido (excluído)</i>
Totalmente visível	Alterada	Realizada	Indiferente	<i>Definido pela histopatologia (*)</i>
Parcial ou não totalmente visível	Sem alterações	Não realizada	Indiferente	<i>Indefinido (excluído)</i>
Parcial ou não totalmente visível	Alterada	Realizada	Indiferente	<i>Definido pela histopatologia (*)</i>

CE: curetagem endocervical, JEC: junção escamo-colunar, ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas.

(*) Nos casos em que se realizou procedimento excisional o status diagnóstico foi definido pela condição mais grave encontrada entre o exame histopatológico da biópsia e do espécime cirúrgico.

As amostras teciduais obtidas por meio de biópsia cervical e/ou curetagem endocervical durante o exame colposcópico foram enviadas para preparo, coloração por HE

(hematoxilina-eosina) e escrutínio no Departamento de Anatomia Patológica do HCB. A avaliação histológica foi realizada por experientes médicos patologistas que possuem atuação com enfoque em oncologia ginecológica e que permaneceram cegos para os resultados dos testes de citologia, HPV e metilação.

A conduta clínica para seguimento e tratamento das pacientes participantes do estudo foi adotada de acordo com o resultado da análise histopatológica dos espécimes biopsiados e da avaliação colposcópica baseando-se nos Protocolos de Atendimento dos Departamentos de Prevenção e Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos em sintonia com as diretrizes ditadas pelo Ministério da Saúde do Brasil²¹.

3.3.2 Processamento e leitura da citologia em meio líquido

As lâminas com os escovados cervicais bem como a coloração das mesmas foram feitas de forma automatizada pelo sistema *PrepMate/PrepStain*[®] (Becton & Dickinson, EUA), procedimento devidamente padronizado no Departamento de Patologia do HCB.

A leitura das lâminas foi executada pelos citotécnicos do Departamento de Patologia conforme os protocolos de rotina do serviço. Os técnicos responsáveis pelo escrutínio das amostras não tinham conhecimento de que elas compunham material para pesquisa e permaneceram cegos para os resultados dos demais testes constantes no estudo.

3.3.3 Detecção qualitativa de HPV de alto risco oncogênico

Partindo-se das amostras de citologias (*SurePath*[®]) coletadas imediatamente antes da colposcopia, realizou-se teste *in vitro* para a detecção do HPV de alto risco oncogênico utilizando-se o *Cobas HPV test*[®] (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ), que está disponível no parque tecnológico do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

O *Cobas HPV test*[®] possibilita a detecção de 14 tipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), podendo processar até 94 amostras simultâneas. O DNA foi extraído por meio de um processo de preparação de

amostra totalmente automatizado usando o instrumento Cobas x480 e as amostras foram então transferidas para um analisador Cobas z480 para a amplificação do DNA de HPV de alto risco por PCR (de acordo com as instruções do fabricante).

Nesse processo, pares de *primers* complementares são utilizados para amplificar a região L1 altamente conservada do genoma de HPV, e sondas oligonucleotídicas fluorescentes específicas para HPV16, HPV18, e para os 12 outros tipos de HPV de alto risco, permitindo a detecção em tempo real dos 12 genótipos de HPV de alto risco e, ainda, a detecção individual de HPV16 e HPV18. A detecção do gene da β -globina humana é realizada na mesma alíquota para fornecer uma medida da adequabilidade da amostra e da qualidade de extração e da amplificação (controle interno). Os controles positivos e negativos são incluídos em cada série e a interpretação da etapa de amplificação e de detecção é realizada usando software fornecido com a plataforma Cobas 4800.

3.3.4 Análise de metilação do DNA

Uma alíquota do frasco de citologia em base líquida (*ThinPrep*[™], Hologic, Marlborough, EUA) foi destinada à pesquisa de metilação em um painel com 15 genes: *HIC1*, *APC*, *CADM1*, *CDH1*, *DAPK1*, *TERT*, *JAM3*, *EPB41L3*, *C13ORF18*, *MAL*, *hsa-miR-124*, *SOX1*, *PAX1*, *LMX1A* e *NKX6-1*. A escolha de tais genes baseou-se no que se julgou ser mais relevante e promissor, de acordo com revisão de literatura.

A análise dos 15 genes descritos foi avaliada e reportada em estudo prévio do mesmo grupo de pesquisadores⁸³. Para a casuística dessa pesquisa levou-se em consideração apenas os genes que se mostraram preditores de lesões de alto grau na análise da associação entre o perfil de metilação e o status de HPV. A Tabela 2 demonstra os processos biológicos e a localização cromossômica dos quatro genes de interesse nesse estudo.

Uma alíquota das mulheres incluídas na pesquisa teve suas amostras avaliadas para os eventos de metilação dos quatro genes descritos. Das 907 mulheres incluídas no estudo 317 (35%) tiveram amostras testadas para definição do perfil de metilação levando-se em consideração distribuição proporcional baseada no diagnóstico final (análise colposcópica associada à histologia). Assim, definiu-se para os testes de metilação amostras com os

seguintes resultados: 104 (32,8%) sem evidência de lesão intraepitelial cervical; 116 (36,6%) com diagnóstico de NIC1 e 97 (30,6%) com lesões NIC2+ (92 NIC 2/3 e 5 CEC).

Tabela 2 - Processos biológicos e localização cromossômica dos genes abordados no estudo.

Gene	Localização cromossômica	Processos biológicos relacionados
<i>LMX1A</i>	1q23.3	Ligação de domínio de transcrição
<i>hsa-miR-124-2</i>	8q12.3	Diferenciação celular
<i>SOX1</i>	13q34	Regulação da transcrição
<i>TERT</i>	5q15.33	Regulação da atividade da telomerase e da transcrição

Fonte: The GeneCards human gene database⁸⁴

3.4 Estratégias para detecção de NIC2+

Foram simuladas diferentes estratégias para detecção de NIC2+ utilizando-se a combinação entre a citologia, o teste de HPV (com ou sem genotipagem) e a metilação do DNA. As estratégias foram utilizadas utilizando-se os testes em modelos isolados ou em associação. Quando simulados em associação os testes foram considerados em paralelo em algumas estratégias (os testes são empregados simultaneamente - coteste) ou como testes em sequência (um dos métodos é empregado apenas num grupo de participantes já previamente rastreado por outro teste – teste reflexo) conforme esquematizado na Figura 10.

As duas propostas de associação dos testes visam medir o ganho de sensibilidade das estratégias quando simulados em paralelo ou ainda o incremento em especificidade quando utilizados como testes em sequência.

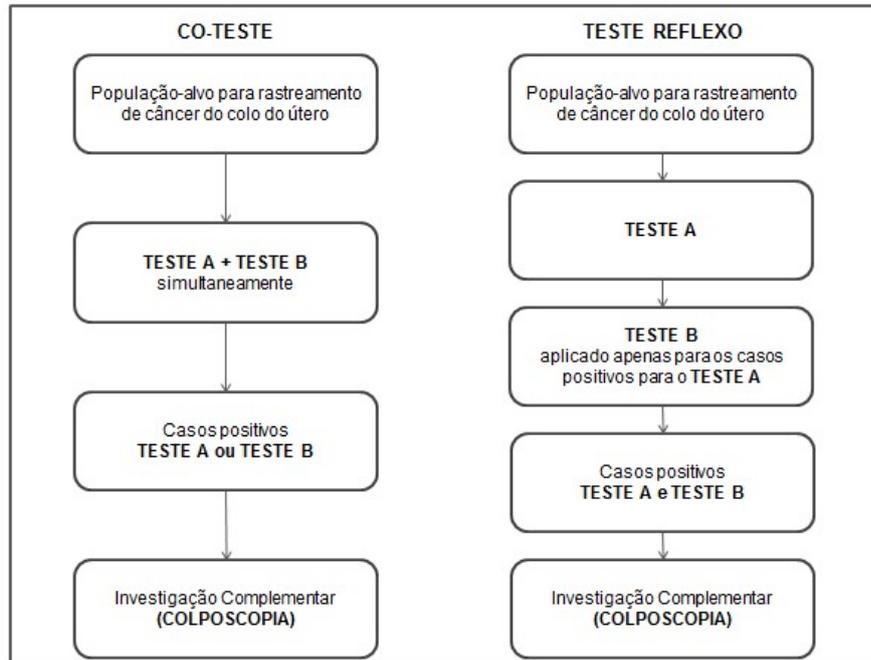


Figura 10 – Esquemática das estratégias simuladas para a detecção de NIC2+ considerando-se a associação entre 2 ou mais testes.

3.5 Análise estatística

Utilizou-se o software *Statistical Package for Social Science for Windows* – SPSS (versão 20) para armazenamento e análise estatística dos dados coletados, levando-se em consideração em todos os testes um nível de significância de 5%. Os resultados dos testes citológicos, de HPV e metilação foram caracterizados por meio de estatística descritiva. A capacidade de detecção de NIC2+ das diferentes estratégias foi avaliada pelos cálculos de sensibilidade e especificidade. A avaliação combinada dos achados colposcópicos, citológicos e histológicos foi considerada para a definição do status diagnóstico, conforme resumido na Tabela 1.

As diferentes estratégias para o diagnóstico de NIC2+ foram comparadas em parte com a estratégia de referência adotada pelas Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero que preconiza encaminhamento direto para colposcopia de todas as mulheres com citologia alterada com laudo de ASC-H (células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau) ou mais grave (ASC-H+). Não foi previsto nesse estudo estratégias que avaliem os resultados de repetição de exames

citológicos como preveem as diretrizes brasileiras que orientam também encaminhamento para colposcopia dos casos com citologias de lesão intraepitelial de baixo grau (LIEBG) e ASC-US que apresentem exames com atipias após nova amostragem.

Além disso, quando se avaliou apenas as estratégias que previam o emprego dos testes moleculares (HPV e metilação) considerou-se como referência para os cálculos de desempenho a estratégia que previa o uso isolado do teste de HPV de alto risco que encaminharia para colposcopia todos os casos testados positivamente (HPV+).

Para fins de comparação entre estratégias foram calculadas as taxas de sensibilidade, especificidade e duas medidas especiais: Razão de NIC2+ e Razão de Colposcopia. A Razão de NIC2+ comparou o desempenho das estratégias simuladas no diagnóstico de lesões de NIC2 ou mais grave e a Razão de Colposcopia comparou o número de mulheres que seriam referenciadas para exame colposcópico pelas estratégias simuladas em relação às estratégias de referência (ASCH+ ou HPV+).

3.6 Aspectos Éticos

Todas as mulheres participantes assinaram o termo de consentimento após receberem explicações e serem devidamente esclarecidas sobre o estudo. O estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CAAE: 20656313.0.0000.5437). Todas as informações que pudessem identificar as participantes foram codificadas para garantir a privacidade delas.

4 RESULTADOS

4.1 Descrição dos resultados dos testes citológico, molecular para pesquisa de HPV de alto risco e histológicos

As características da população do estudo encontram-se na Tabela 3. Um total de 907 mulheres, com idade variando de 25 a 69 anos (média=41,6 anos; dp=10,8 anos; mediana=41,0 anos) foi considerado na análise, sendo que 406 (44,8%) apresentaram citologia alterada (\geq ASC-US) e 465 tiveram teste positivo para HPV-AR (51,3%).

Tabela 3 – Número e porcentagem de casos segundo as variáveis idade da população, características do exame colposcópico e resultados dos testes citológicos, HPV e histopatológicos.

Variável	Categoria	N	(%)
Idade	25-29 anos	132	(14,5)
	30-49 anos	543	(59,9)
	50-69 anos	232	(25,6)
Visibilidade da JEC	Totalmente visível	761	(83,9)
	Não totalmente visível	146	(16,1)
Biópsia cervical	Sim	675	(74,4)
	Não	232	(25,6)
Citologia cervical	Negativa para neoplasia	501	(55,2)
	ASC-US	91	(10,0)
	LIEBG	90	(9,9)
	ASC-H	81	(8,9)
	LIEAG	119	(13,1)
	AGC	17	(1,9)
	AIS	6	(0,7)
	AC invasor	1	(0,1)
	CEC invasor	1	(0,1)

HPV de alto risco ^(a)	Sim	465	(51,3)
	Não	442	(48,7)
HPV-16 ^(b)	Sim	154	(17,1)
	Não	748	(82,9)
HPV-18 ^(c)	Sim	34	(3,8)
	Não	866	(96,2)
HPV-outros (não 16, não 18) ^(d)	Sim	356	(39,3)
	Não	549	(60,7)
Avaliação anatomopatológica ^(e)	Sem doença	472	(52,1)
	NIC1	219	(24,1)
	NIC2	54	(6,0)
	NIC3	138	(15,2)
	CEC	20	(2,2)
	AIS	3	(0,3)
	AC invasor	1	(0,1)

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau; LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau; AGC: células glandulares atípicas (inclui células glandulares atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas – AGC-US, e células glandulares atípicas de significado indeterminado, não podendo excluir lesão de alto grau – AGC-H); AIS: adenocarcinoma “*in situ*”; AC invasor: adenocarcinoma invasor; CEC: carcinoma epidermóide invasor.

NIC1 – lesão intraepitelial cervical de baixo grau; NIC2/3 – lesão intraepitelial cervical de alto grau.

^(a)Co-infecção por HPV foi registrada em 75 casos, ^(b)5 amostras apresentaram testes inválidos para HPV-16, ^(c)7 amostras apresentaram testes inválidos para HPV-18, ^(d)2 amostras apresentaram testes inválidos para HPV-outros, ^(e)engloba os resultados de biópsias, curetagem endocervical ou procedimentos excisionais.

Os resultados comparativos entre os testes citológicos e de HPV e o status diagnóstico estão detalhados na Tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos casos de acordo com o resultado da citologia, teste do HPV e o status diagnóstico.

Teste	Resultado	Status Diagnóstico						TOTAL
		Sem doença	NIC1	NIC2/3	CEC	AC <i>in situ</i>	AC invasor	
Citologia	Negativo para neoplasia	387 (77,2%)	93 (18,6%)	20 (4,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	501 (100%)
	ASC-US	27 (29,7%)	43 (47,2%)	19 (20,9%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	91 (100%)
	LIEBG	13 (14,4%)	39 (43,3%)	36 (40,0%)	2 (2,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	90 (100%)
	ASC-H ⁽¹⁾	45 (20,0%)	44 (19,6%)	117 (52,0%)	16 (7,1%)	2 (0,9%)	1 (0,4%)	225 (100%)
HPV-AR	Negativo	337 (76,2%)	89 (20,1%)	13 (3,0%)	2 (0,5%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	442 (100%)
	Positivo	135 (29,0%)	130 (28,0%)	179 (38,5%)	18 (3,9%)	3 (0,6%)	0 (0,0%)	465 (100%)

NIC1 – lesão intraepitelial cervical de baixo grau; NIC2/3 – lesão intraepitelial cervical de alto grau; CEC: Carcinoma epidermóide invasor; AC *in situ* – Adenocarcinoma cervical “*in situ*”; AC invasor – Adenocarcinoma cervical invasor; HPV-AR: Papilomavírus Humano incluindo os 14 tipos de alto risco oncogênico testados no estudo.

⁽¹⁾ inclui os resultados citológicos: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial de alto grau (LIEAG), células glandulares atípicas, adenocarcinoma “*in situ*” e invasor, carcinoma epidermóide invasor.

4.2 Descrição das estratégias simuladas para detecção de NIC2+

No total foram simuladas 131 estratégias para detecção de NIC2+ sendo os resultados divididos em 3 grandes blocos: (1) estratégias que combinaram testes citológicos e de HPV levando-se em consideração como referência o emprego isolado de citologia (ASC-H+) para comparação; (2) estratégias que combinaram testes citológicos, HPV e metilação levando-se em consideração como referência o emprego isolado de citologia (ASC-H+) para comparação

e (3) estratégias que combinaram testes de HPV e metilação levando-se em consideração como referência o emprego isolado de testes de HPV (HPV+) (Figura 11).

Testes Empregados (isolados ou em associação)	Quantidade de Estratégias Simuladas	Estratégia de Referência
Citologia HPV	39	ASC-H+
Citologia HPV Metilação	91	ASC-H+
HPV Metilação	17	HPV+

Figura 11 – Quantidade de estratégias simuladas para detecção de NIC2+ de acordo com os testes empregados e o modelo de referência para comparação.

ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar de lesão de alto grau; HPV: Papilomavírus Humano.

4.2.1 Descrição das estratégias considerando o emprego de citologia e HPV (referência de comparação ASC-H+)

As tabelas 5 a 7 detalham as estratégias simuladas levando-se em consideração os testes citológicos e de HPV isolados ou em associação simultânea (coteste) ou sequenciais (testes reflexos). Para todas as comparações, levou-se em consideração a estratégia 3 como referência (ASC-H+). Essa estratégia simula em parte o modelo adotado pelo programa de rastreamento de câncer do colo do útero no Brasil que se baseia no teste de Papanicolaou isolado e orienta encaminhamento imediato para exames de colposcopia as mulheres com resultados ASC-H+ tendo sido verificado para esse modelo de rastreio específico taxa de sensibilidade de 63% e especificidade de 87,1% para detecção de NIC2+.

Estratégias baseadas em testes isolados, utilizando-se citologia e HPV (1 a 7):

Tabela 5 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes isolados (citologia e HPV) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreio Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
<i>Estratégias baseadas em testes Isolados</i>								
1	Citologia isolada (ASC-US+)	907	406	195	1,43	1,80	90,3 [↑]	69,5 [↓]
2	Citologia isolada (LIEBG+)	907	315	174	1,28	1,40	80,6 [↑]	79,6 [↓]
3 ⁽¹⁾	Citologia isolada (ASC-H+)	907	225	136	1,00	1,00	63,0	87,1
4	Citologia isolada (LIEAG+)	907	125	93	0,68	0,56	43,1 [↓]	95,4 [↑]
5	HPV+ isolado (sem genotipagem)	907	465	200	1,47	2,07	92,6 [↑]	61,6 [↓]
6	HPV16/18+ isolado	903	182	106	0,78	0,81	49,3 [↓]	89,0
7	HPV não16/18+ isolado	907	356	133	0,98	1,58	61,6	67,7 [↓]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau. LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau. LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

(^{↑↓}) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

Entre as estratégias que usaram testes isolados, as estratégias 1 (ASC-US+), 2 (LIEBG+) e 5 (HPV+) apresentaram taxas de sensibilidade significativamente maiores em relação à referência (ASC-H+), sendo respectivamente 90,3%, 80,6% e 92,6%. Para essas estratégias também se notou acréscimo na razão de colposcopia na ordem de 80% (ASC-US+), 40% (LIEBG+) e 107% (HPV+). As estratégias 4 (LIEAG+) e 6 (HPV16/18+) apresentaram menor sensibilidade para o diagnóstico de NIC2+. A sensibilidade da estratégia 7 (HPV não 16/18+) foi semelhante à da estratégia de referência, mas com redução significativa da especificidade.

Estratégias baseadas em coteste, utilizando-se citologia e HPV (8 a 19):

Tabela 6 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de cotestes (citologia e HPV) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreamento Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
Estratégias baseadas em coteste								
3 ⁽¹⁾	Citologia isolada (ASC-H+)	907	225	136	1,00	1,00	63,0	87,1
8	Coteste HPV+ ou Citologia ASC-US+	907	538	210	1,54	2,39	97,2 [↑]	52,5 [↓]
9	Coteste HPV+ ou Citologia LIEBG+	907	507	208	1,53	2,25	96,3 [↑]	56,7 [↓]
10	Coteste HPV+ ou Citologia ASC-H+	907	496	208	1,53	2,21	96,3 [↑]	58,3 [↓]
11	Coteste HPV+ ou Citologia LIEAG+	907	475	206	1,51	2,11	95,4 [↑]	61,1 [↓]
12	Coteste HPV16/18+ ou Citologia ASC-US+	906	441	201	1,48	1,96	93,5 [↑]	65,3 [↓]
13	Coteste HPV16/18+ ou Citologia LIEBG+	905	370	190	1,40	1,65	88,4 [↑]	73,9 [↓]
14	Coteste HPV16/18+ ou Citologia ASC-H+	905	309	169	1,24	1,38	78,6 [↑]	79,7 [↓]
15	Coteste HPV16/18+ ou Citologia LIEAG+	904	249	150	1,10	1,11	69,8	85,6
16	Coteste HPV não16/18+ ou Citologia ASC-US+	907	513	205	1,51	2,28	94,9 [↑]	55,4 [↓]
17	Coteste HPV não16/18+ ou Citologia LIEBG+	907	473	197	1,45	2,10	91,2 [↑]	60,1 [↓]
18	Coteste HPV não16/18+ ou Citologia ASC-H+	907	445	184	1,35	1,98	85,2 [↑]	62,2 [↓]
19	Coteste HPV não16/18+ ou Citologia LIEAG+	907	404	171	1,26	1,80	79,2 [↑]	66,3 [↓]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau. LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau. LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

(^{↑↓}) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

Quando se avaliou o emprego simultâneo de teste citológico e HPV, todas as estratégias simuladas apresentaram taxa de sensibilidade superior à estratégia 3 (ASC-H+). Apenas para a estratégia 15 (coteste HPV16/18+ ou citologia LIEAG+) a taxa de sensibilidade encontrada de 69,8% não apresentou diferença significativa para a estratégia ASC-H+.

A estratégia 8, que considerou como rastreamento positivo o grupo de mulheres com testes citológicos alterados (ASC-US+) ou com testes positivos para HPV (HPV+) forneceu a maior sensibilidade entre todas as estratégias simuladas no estudo. Essa estratégia foi capaz de diagnosticar 97,2% dos casos de NIC2+ (210/216), com acréscimo de 139% na demanda por colposcopias.

Estratégias baseadas em testes reflexos, utilizando-se citologia e HPV (20 a 39):

Tabela 7 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes reflexos (com combinação de citologia e HPV) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreio Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
Estratégias baseadas em testes reflexos								
3 ⁽¹⁾	Citologia isolada (ASC-H+)	907	225	136	1,00	1,00	63,0	87,1
20	HPV+ e Citologia reflexa ASC-US+	907	333	185	1,36	1,48	85,6 [↑]	78,6 [↓]
21	HPV+ e Citologia reflexa LIEBG+	907	273	166	1,22	1,21	76,9 [↑]	84,5 [↓]
22	HPV+ e Citologia reflexa ASC-H+	907	194	128	0,94	0,86	59,3 [↓]	90,4 [↑]
23	HPV+ e Citologia reflexa LIEAG+	907	115	87	0,64	0,51	40,3 [↓]	95,9 [↑]
24	HPV16/18+ e Citologia reflexa ASC-US+	903	147	100	0,74	0,66	46,5 [↓]	93,2 [↑]
25	HPV16/18+ e Citologia reflexa LIEBG+	903	127	90	0,66	0,57	41,9 [↓]	94,6 [↑]
26	HPV16/18+ e Citologia reflexa ASC-H+	903	98	73	0,54	0,17	34,0 [↓]	96,4 [↑]
27	HPV16/18+ e Citologia reflexa LIEAG+	903	58	49	0,36	0,26	22,8 [↓]	98,7 [↑]
28	HPV não16/18+ e Citologia reflexa ASC-US+	907	249	123	0,90	1,11	56,9	81,8 [↓]
29	HPV não16/18+ e Citologia reflexa LIEBG+	907	198	110	0,81	0,88	50,9 [↓]	87,3 [↑]
30	HPV não16/18+ e Citologia reflexa ASC-H+	907	136	85	0,63	0,60	39,4 [↓]	92,6 [↑]
31	HPV não16/18+ e Citologia reflexa LIEAG+	907	77	55	0,40	0,34	25,5 [↓]	96,8 [↑]
32	HPV+ e citologia reflexa ASC-US+ entre HPV não16/18+	903	365	191	1,40	1,63	88,8 [↑]	74,7 [↓]
33	HPV+ e citologia reflexa LIEBG+ entre HPV não16/18+	903	323	182	1,34	1,44	84,7 [↑]	79,1 [↓]
34	HPV+ e citologia reflexa ASC-H+ entre HPV não16/18+	903	276	161	1,18	1,23	74,9 [↑]	83,3 [↓]
35	HPV+ e citologia reflexa LIEAG+ entre HPV não16/18+	903	238	144	1,06	1,06	67,0	86,3
36	HPV+ e Citologia reflexa ASC-US+ entre HPV16/18+	907	439	195	1,43	1,95	90,3 [↑]	64,7 [↓]
37	HPV+ e Citologia reflexa LIEBG+ entre HPV16/18+	907	430	189	1,39	1,91	87,5 [↑]	65,1 [↓]
38	HPV+ e Citologia reflexa ASC-H+ entre HPV16/18+	907	413	176	1,29	1,84	81,5 [↑]	65,7 [↓]
39	HPV+ e Citologia reflexa LIEAG+ entre HPV16/18+	907	394	165	1,21	1,75	76,4 [↑]	66,9 [↓]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau. LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau. LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

([↑][↓]) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

As estratégias de 20 a 39 simularam modelos de rastreio primário por HPV (com ou sem genotipagem) e posterior emprego da citologia como teste reflexo empregado apenas entre mulheres com exames positivos para HPV.

As estratégias 20 (HPV+ e triagem com citologia ASC-US+) e 21 (HPV+ e triagem com citologia LIEBG+) demonstram sensibilidade significativamente maior que a estratégia de referência, às custas de acréscimo de 48% e 21% respectivamente na demanda por colposcopias.

Por outro lado, as estratégias que previam uso inicial do teste HPV com genotipagem e posterior citologia reflexa, considerando-se para investigação os casos com HPV16/18 positivo (estratégias 24, 25, 26 e 27) ou com HPV não16/18 positivos (estratégias 28, 29, 30 e 31) não obtiveram melhor desempenho que a estratégia 3 (referência) com taxas de sensibilidade inferiores à 60%.

Considerando-se o emprego de citologia reflexa após genotipagem, identificou-se aumento variável nas taxas de sensibilidade. Utilizando-se o parâmetro de encaminhar para colposcopia todos os casos positivos para HPV 16/18 e aqueles com infecção confirmada por tipos não16/18 e com citologia anormal (estratégia 32), verificou-se incremento de 40% na detecção de NIC2+ à custa de elevação de 63% na demanda por colposcopias.

Ao se orientar a investigação apenas de casos com citologia reflexa com laudo LIEBG+ (estratégia 33) verificou-se sensibilidade de 84,7%, com aumento de 44% no número de exames coloscópicos. Já para a estratégia 34, que elege para colposcopia as mulheres com citologias ASC-H+, verificou-se sensibilidade igual a 74,9% e 23% de incremento na necessidade de colposcopias.

Na figura 12 estão destacadas as seis estratégias que demonstraram desempenho superior em termos de sensibilidade com significância estatística e que obtiveram razão de colposcopia de até 1,5 quando comparadas à estratégia de referência (ASC-H+).

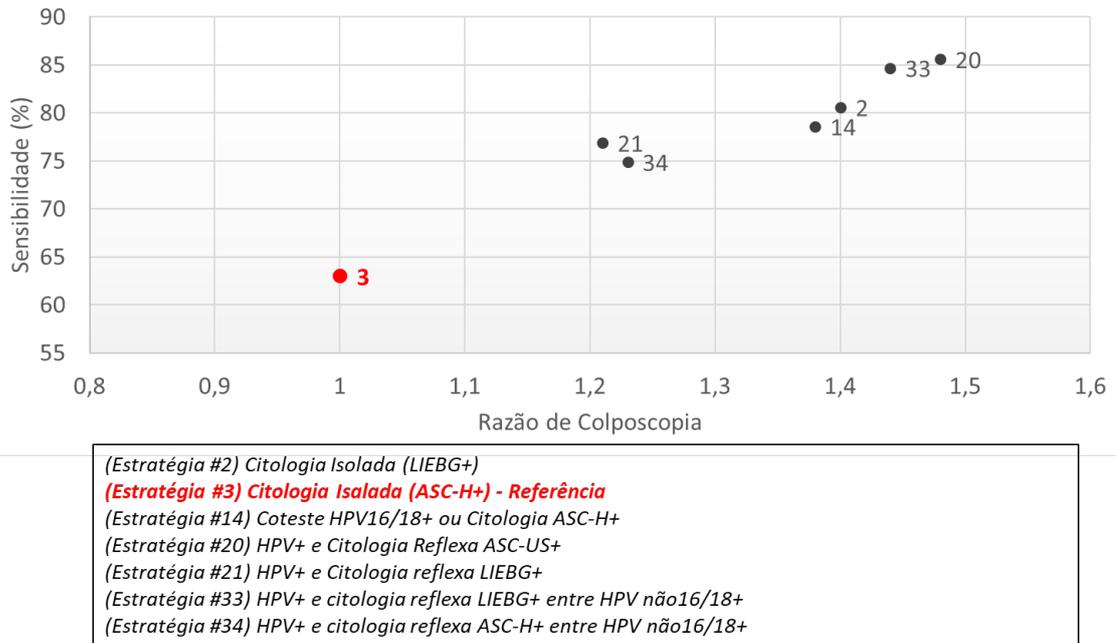


Figura 12 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 63,0% e razão de colposcopia de até 1,5).

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau; HPV: Papilomavírus Humano.

Dentre as seis estratégias detalhadas que demonstraram taxas de sensibilidade superior a estratégia de referência três modelos simulados obtiveram índices superiores a 80% de sensibilidade conforme esquematizado na figura 13.

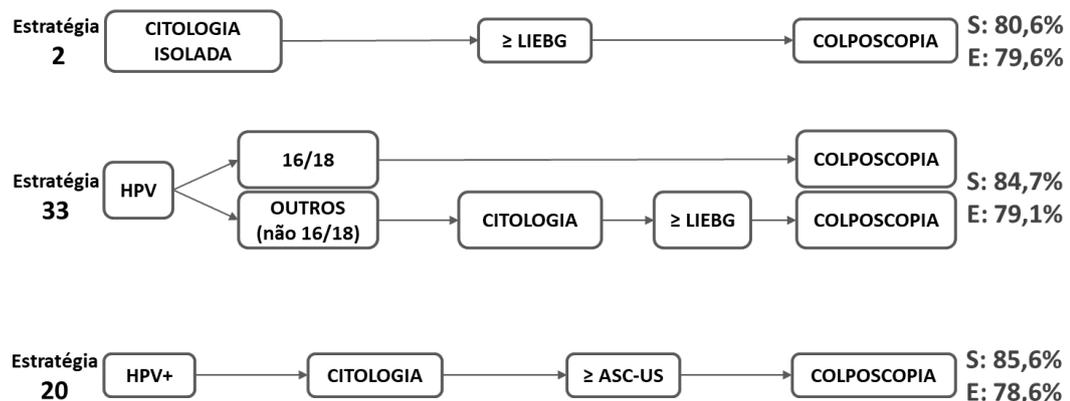


Figura 13 – Esquematização das estratégias que demonstraram taxas de sensibilidade superiores a 80% e razão de colposcopia de até 1,5.

S: sensibilidade; E: especificidade; HPV: Papilomavírus Humano; LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas.

4.2.2 Descrição das estratégias considerando o emprego de citologia, HPV e metilação do DNA (referência de comparação ASC-H+)

Nas Tabelas de 8 a 10 estão detalhadas as estratégias simuladas levando-se em consideração os resultados da citologia, teste HPV e o perfil de metilação do DNA. Todas as estratégias simuladas tanto em modelos de testes isolados quanto em associação (coteste e reflexo) foram comparadas com a estratégia número 3 (ASC-H+) que considera positivo o rastreamento com testes citológicos com laudos de ASC-H ou mais graves.

Considerando-se que os testes de metilação dos diferentes genes descritos foram empregados em subgrupo da população de estudo (317 mulheres) obteve-se diferentes taxas de sensibilidade e especificidade da estratégia de referência (#3) em relação ao descrito anteriormente para a população total de 907 mulheres, sendo a sensibilidade obtida para esse subgrupo de 60,8% e a especificidade de 84,1%.

Estratégias baseadas em testes isolados, utilizando-se metilação do DNA (40 a 44):

Na tabela 8 os testes foram descritos isoladamente considerando-se a hipermetilação dos genes has-miR-124-2, LMX1A, SOX1 e TERT e em grupo simulando estratégia que considerasse positivo o rastreamento quando um ou mais de um teste estivesse positivo (estratégia 44). Foram simuladas adicionalmente estratégias que previam o agrupamento de 2 ou 3 testes, porém optou-se por não detalhar essas possibilidades uma vez que não se verificou resultados significativos.

Ao se avaliar o emprego isolado dos testes de metilação, os resultados para o gene hsa-miR-124-2 demonstraram aumento na taxa de sensibilidade quando comparado a estratégia com citologia isolada (ASC-H+), porém com diminuição significativa da taxa de especificidade. Agrupando-se os resultados de metilação dos quatro genes testados e considerando-se positivo o rastreamento na presença de hipermetilação de qualquer um dos genes verificou-se sensibilidade de 94,8% e especificidade de 46,4%.

Tabela 8 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas utilizando-se testes isolados (metilação) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreio Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
<i>Estratégias baseadas em testes isolados</i>								
3 ⁽¹⁾	<i>Citologia isolada (ASC-H+)</i>	317	94	59	1,00	1,00	60,8	84,1
40	<i>has-miR-124-2 isolado</i>	317	175	85	1,44	1,86	87,6 [↑]	59,1 [↓]
41	<i>LMX1A isolado</i>	317	67	46	0,78	0,71	47,4	90,5 [↑]
42	<i>SOX1 isolado</i>	317	110	64	1,08	1,17	66,0	79,1
43	<i>TERT isolado</i>	317	118	64	1,08	1,26	66,0	75,5 [↓]
44	<i>Metilação+ (qualquer um)</i>	317	210	92	1,56	2,23	94,8 [↑]	46,4 [↓]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

Estratégias baseadas em coteste, utilizando-se citologia, HPV e metilação (45 a 79):

Na tabela 9 estão descritos os resultados que avaliaram a associação dos testes citológicos, molecular para detecção de HPV e metilação simulados em 34 modelos de testes paralelos (cotestes). Os diferentes genes testados para hipermetilação foram inicialmente agrupados com exames de HPV (com ou sem genotipagem) e na sequência com a citologia (considerando as diversas atipias).

Os resultados obtidos indicam que a possibilidade de associação dos testes de metilação seja com a citologia ou com o HPV promovem aumento na sensibilidade para detecção de lesões NIC2+ com diminuição concomitante das taxas de especificidade. A estratégia 64 que prevê o emprego simultâneo de citologia (considerando resultados ASC-US+) e metilação positiva para qualquer um dos genes avaliados apresentou a maior sensibilidade com taxa de 99,0%, porém com especificidade de 29,5% o que representou aumento de 167% na demanda por colposcopias quando comparado a estratégia 3' (ASC-H+).

Tabela 9 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de cotestes (citologia, HPV e metilação) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreio Positivo)	(N)	Coloscopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Coloscopia	S	E
Estratégias baseadas em coteste								
3 ⁽¹⁾	Citologia isolada (ASC-H+)	317	94	59	1,00	1,00	60,8	84,1
45	Coteste HPV+ ou has-miR-124-2+	317	243	95	1,61	2,59	97,9 [↑]	32,7 [↓]
46	Coteste HPV+ ou LMX1A+	317	204	91	1,54	2,17	93,8 [↑]	48,6 [↓]
47	Coteste HPV+ ou SOX1+	317	218	93	1,58	2,32	95,9 [↑]	43,2 [↓]
48	Coteste HPV+ ou TERT+	317	223	92	1,56	2,37	94,8 [↑]	40,5 [↓]
49	Coteste HPV+ ou Metilação+	317	259	95	1,61	2,76	97,9 [↑]	25,5 [↓]
50	Coteste HPV16/18+ ou has-miR-124-2+	316	200	89	1,51	2,13	91,8 [↑]	49,5 [↓]
51	Coteste HPV16/18+ ou LMX1A+	316	115	65	1,10	1,22	67,7	77,3 [↓]
52	Coteste HPV16/18+ ou SOX1+	316	151	75	1,27	1,61	78,1 [↑]	65,5 [↓]
53	Coteste HPV16/18+ ou TERT+	316	150	72	1,22	1,60	75,0 [↑]	64,5 [↓]
54	Coteste HPV16/18+ ou Metilação+	316	229	93	1,58	2,44	95,9 [↑]	38,2 [↓]
55	Coteste HPV não16/18+ ou Has-miR-124-2+	317	230	92	1,56	2,45	94,8 [↑]	37,3 [↓]
56	Coteste HPV não16/18+ ou LMX1A+	317	181	81	1,37	1,92	83,5 [↑]	54,5 [↓]
57	Coteste HPV não16/18+ ou SOX1+	317	197	86	1,46	2,10	88,7 [↑]	49,5 [↓]
58	Coteste HPV não16/18+ ou TERT+	317	206	88	1,49	2,19	90,7 [↑]	46,4 [↓]
59	Coteste HPV não16/18+ ou Metilação+	317	249	95	1,61	2,65	97,9 [↑]	30,0 [↓]
60	Coteste Citologia (ASC-US+) ou has-miR-124-2+	317	229	94	1,59	2,44	96,9 [↑]	38,6 [↓]
61	Coteste Citologia (ASC-US+) ou LMX1A+	317	184	91	1,54	1,96	93,8 [↑]	57,7 [↓]
62	Coteste Citologia (ASC-US+) ou SOX1+	317	198	91	1,54	2,11	93,8 [↑]	51,4 [↓]
63	Coteste Citologia (ASC-US+) ou TERT+	317	208	92	1,56	2,21	94,8 [↑]	47,3 [↓]
64	Coteste Citologia (ASC-US+) ou Metilação+	317	251	96	1,63	2,67	99,0 [↑]	29,5 [↓]
65	Coteste Citologia (ASC-H+) ou has-miR-124-2+	317	191	88	1,49	2,03	90,7 [↑]	53,2 [↓]
66	Coteste Citologia (ASC-H+) ou LMX1A+	317	119	74	1,25	1,27	76,3 [↑]	79,5 [↓]
67	Coteste Citologia (ASC-H+) ou SOX1+	317	143	77	1,31	1,52	79,4 [↑]	70,0 [↓]
68	Coteste Citologia (ASC-H+) ou TERT+	317	149	82	1,39	1,59	84,5 [↑]	65,0 [↓]
69	Coteste Citologia (ASC-H+) ou Metilação+	317	223	93	1,58	2,37	95,9 [↑]	40,9 [↓]
70	Coteste Citologia (LIEBG+) ou has-miR-124-2+	317	215	93	1,58	2,29	95,9 [↑]	44,5 [↓]
71	Coteste Citologia (LIEBG+) ou LMX1A+	317	158	87	1,47	1,68	89,7 [↑]	67,7 [↓]
72	Coteste Citologia (LIEBG+) ou SOX1+	317	175	88	1,49	1,86	90,7 [↑]	60,5 [↓]
73	Coteste Citologia (LIEBG+) ou TERT+	317	186	89	1,49	1,98	91,8 [↑]	55,9 [↓]
74	Coteste Citologia (LIEBG+) ou Metilação+	317	239	95	1,61	2,54	97,9 [↑]	34,5 [↓]
75	Coteste Citologia (LIEAG+) ou has-miR-124-2+	317	179	85	1,44	1,90	87,6 [↑]	57,3 [↓]
76	Coteste Citologia (LIEAG+) ou LMX1A+	317	91	61	1,03	0,97	62,9	86,4
77	Coteste Citologia (LIEAG+) ou SOX1+	317	127	72	1,22	1,35	74,2 [↑]	75,5 [↓]
78	Coteste Citologia (LIEAG+) ou TERT+	317	140	77	1,31	1,49	79,4 [↑]	71,4 [↓]
79	Coteste Citologia (LIEAG+) ou Metilação+	317	214	92	1,56	2,28	94,8 [↑]	44,5 [↓]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau.

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau. LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

([↑]_↓) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

Estratégias baseadas em testes reflexos, utilizando-se citologia, HPV e metilação (80 a 136):

Simulou-se 51 diferentes estratégias que previam o emprego dos testes citológico, HPV e metilação em modelos sequenciais (testes reflexos).

Tabela 10 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas por meio de testes reflexos (com combinação de citologia, HPV e metilação) na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreamento Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
Estratégias baseadas em testes reflexos								
3 ⁽¹⁾	Citologia isolada (ASC-H+)	317	94	59	1,00	1,00	60,8	84,1
80	HPV+ e metilação reflexa (has-miR-124-2+)	317	129	78	1,32	1,37	80,4 [↑]	76,8 [↓]
81	HPV+ e metilação reflexa LMX1A+	317	60	43	0,73	0,64	44,3 [↓]	92,3 [↑]
82	HPV+ e metilação reflexa SOX1+	317	89	59	1,00	0,95	60,8	86,4
83	HPV+ e metilação reflexa TERT+	317	92	60	1,02	0,98	61,9	85,5
84	HPV+ e metilação reflexa Metilação+	317	148	85	1,44	1,57	87,6 [↑]	71,4 [↓]
85	HPV16/18+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	316	48	35	0,59	0,51	36,5 [↓]	94,1 [↑]
86	HPV16/18+ e metilação reflexa LMX1A+	316	25	20	0,34	0,27	20,8 [↓]	97,7 [↑]
87	HPV16/18+ e metilação reflexa SOX1+	316	32	28	0,47	0,34	29,2 [↓]	98,2 [↑]
88	HPV16/18+ e metilação reflexa TERT+	316	41	31	0,53	0,44	32,3 [↓]	95,5 [↑]
89	HPV16/18+ e metilação reflexa Metilação+	316	54	38	0,64	0,57	39,6 [↓]	92,7 [↑]
90	HPV não16/18+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	317	100	55	0,93	1,06	56,7	79,5
91	HPV não16/18+ e metilação reflexa LMX1A+	317	41	27	0,46	0,44	27,8 [↓]	93,6 [↑]
92	HPV não16/18+ e metilação reflexa SOX1+	317	68	40	0,68	0,72	41,2 [↓]	87,3
93	HPV não16/18+ e metilação reflexa TERT+	317	67	38	0,64	0,71	39,2 [↓]	86,8
94	HPV não16/18+ e metilação reflexa Metilação+	317	116	59	1,00	1,23	60,8	74,1 [↓]
95	HPV+ e metilação reflexa has-miR-124-2+ entre HPV não16/18+	316	153	81	1,37	1,63	84,4 [↑]	67,3 [↓]
96	HPV+ e metilação reflexa LMX1A+ entre HPV não16/18+	316	108	62	1,05	1,15	64,6	79,1
97	HPV+ e metilação reflexa SOX1+ entre HPV não16/18+	316	130	70	1,19	1,38	72,9	72,7 [↓]
98	HPV+ e metilação reflexa TERT+ entre HPV não16/18+	316	124	68	1,15	1,32	70,8	74,5 [↓]
99	HPV+ e metilação reflexa Metilação+ entre HPV não16/18+	316	166	85	1,44	1,77	88,5 [↑]	63,2 [↓]

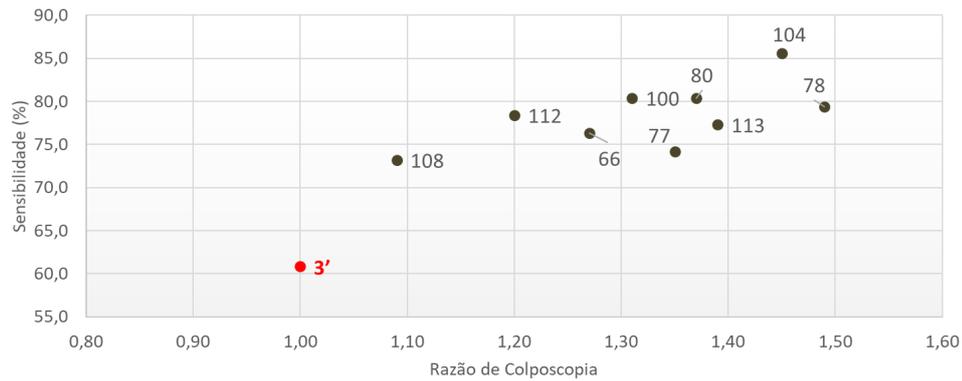
100	ASC-US+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	317	123	78	1,32	1,31	80,4 [↑]	79,5
101	ASC-US+ e metilação reflexa LMX1A+	317	60	42	0,71	0,64	43,3 [↓]	91,8 [↑]
102	ASC-US+ e metilação reflexa SOX1+	317	89	60	1,02	0,95	61,9	86,8
103	ASC-US+ e metilação reflexa TERT+	317	87	59	1,00	0,93	60,8	87,3
104	ASC-US+ e metilação reflexa Metilação+	317	136	83	1,41	1,45	85,6 [↑]	75,9 [↓]
105	ASC-US+ e HPV reflexo HPV+	317	152	81	1,37	1,62	83,5 [↑]	67,7 [↓]
106	ASC-US+ e HPV reflexo HPV16/18+	317	61	37	0,63	0,65	38,1 [↓]	89,1
107	ASC-US+ e HPV reflexo HPV não16/18+	317	117	57	0,97	1,24	58,8	72,7 [↓]
108	LIEBG+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	317	102	71	1,20	1,09	73,2 [↑]	85,9
109	LIEBG+ e metilação reflexa LMX1A+	317	51	38	0,64	0,54	39,2 [↓]	94,1 [↑]
110	LIEBG+ e metilação reflexa SOX1+	317	77	55	0,93	0,82	56,7	90,0 [↑]
111	LIEBG+ e metilação reflexa TERT+	317	74	54	0,92	0,79	55,7	90,9 [↑]
112	LIEBG+ e metilação reflexa Metilação+	317	113	76	1,29	1,20	78,4 [↑]	83,2
113	LIEBG+ e HPV reflexo HPV+	317	131	75	1,27	1,39	77,3 [↑]	74,5 [↓]
114	LIEBG+ e HPV reflexo HPV16/18+	317	56	33	0,56	0,60	34,0 [↓]	89,5 [↑]
115	LIEBG+ e HPV reflexo HPV não16/18+	317	98	53	0,90	1,04	54,6	79,5
116	ASC-H+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	317	78	56	0,95	0,83	57,7	90,0 [↑]
117	ASC-H+ e metilação reflexa LMX1A+	317	42	31	0,53	0,45	32,0 [↓]	95,0 [↑]
118	ASC-H+ e metilação reflexa SOX1+	317	61	46	0,78	0,65	47,4 [↓]	93,2 [↑]
119	ASC-H+ e metilação reflexa TERT+	317	53	41	0,69	0,56	42,3 [↓]	94,5 [↑]
120	ASC-H+ e metilação reflexa Metilação+	317	81	58	0,98	0,86	59,8	89,5 [↑]
121	ASC-H+ e HPV reflexo HPV+	317	87	55	0,93	0,92	56,7	85,5
122	ASC-H+ e HPV reflexo HPV16/18+	317	37	24	0,41	0,39	24,7 [↓]	94,1 [↑]
123	ASC-H+ e HPV reflexo HPV não16/18+	317	64	39	0,66	0,68	40,2 [↓]	88,6 [↑]
124	LIEAG+ e metilação reflexa has-miR-124-2+	317	52	40	0,68	0,55	41,2 [↓]	94,5 [↑]
125	LIEAG+ e metilação reflexa LMX1A+	317	32	25	0,42	0,34	25,8 [↓]	96,8 [↑]
126	LIEAG+ e metilação reflexa SOX1+	317	40	32	0,54	0,43	33,0 [↓]	96,4 [↑]
127	LIEAG+ e metilação reflexa TERT+	317	34	27	0,46	0,46	27,8 [↓]	96,8 [↑]
128	LIEAG+ e metilação reflexa Metilação+	317	52	40	0,68	0,55	41,2 [↓]	94,5 [↑]
129	LIEAG+ e HPV reflexo HPV+	317	52	37	0,63	0,55	38,1 [↓]	93,2 [↑]
130	LIEAG+ e HPV reflexo HPV16/18+	317	22	17	0,29	0,23	17,5 [↓]	97,5 [↑]
131	LIEAG+ e HPV reflexo HPV não16/18+	317	37	24	0,41	0,39	24,7 [↓]	94,1 [↑]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas. ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode afastar lesão de alto grau. LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau. LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

⁽¹⁾ Estratégia padrão de referência para rastreamento de câncer cervical adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (encaminhamento direto para colposcopia sem necessidade de repetir a citologia de mulheres com citologias com laudo de ASC-H+).

([↑][↓]) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

Na figura 14 estão destacadas as nove estratégias que demonstraram desempenho superior em termos de sensibilidade com significância estatística e que obtiveram razão de colposcopia de até 1,5 quando comparadas à estratégia de referência (ASC-H+).



(Estratégia #3') Citologia Isalada (ASC-H+) - Referência

(Estratégia #66) Coteste Citologia (ASC-H+) ou LMX1A+
 (Estratégia #77) Coteste Citologia (LIEAG+) ou SOX1+
 (Estratégia #78) Coteste Citologia (LIEAG+) ou TERT+
 (Estratégia #80) HPV+ e metilação reflexa (has-miR-124-2+)
 (Estratégia #100) ASCUS+ e metilação reflexa has-miR-124-2+
 (Estratégia #104) ASCUS+ e metilação reflexa Metilação+
 (Estratégia #108) LIEBG+ e metilação reflexa has-miR-124-2+
 (Estratégia #112) LIEBG+ e metilação reflexa Metilação+
 (Estratégia #113) LIEBG+ e HPV reflexo HPV+

Figura 14 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 60,8% e razão de colposcopia de até 1,5).

HPV: Papilomavírus Humano; LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau.

Dentre as nove estratégias detalhadas que demonstraram taxas de sensibilidade superior à estratégia de referência três modelos simulados obtiveram índices superiores a 80% de sensibilidade conforme esquematizado na figura 15.

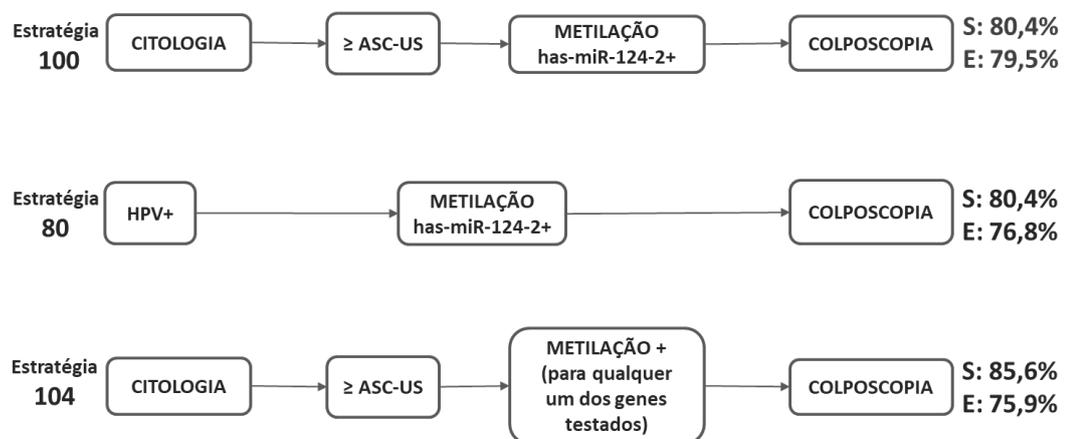


Figura 15 – Esquematização das estratégias que demonstraram taxas de sensibilidade superiores a 80% e razão de colposcopia de até 1,5.

S: sensibilidade; E: especificidade; HPV: Papilomavírus Humano; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas.

4.2.3 Descrição das estratégias considerando o emprego de HPV e metilação do DNA (referência de comparação HPV+)

Na Tabela 11 estão demonstradas as estratégias simuladas no estudo usando o teste de HPV e a metilação isoladamente ou combinados simultaneamente (coteste) ou sequencialmente (teste reflexo). A estratégia 5' que simula o rastreamento de lesões NIC2+ com teste isolado de HPV e encaminharia para colposcopia todas as mulheres com testes positivos independentemente do tipo viral foi considerada como referência. Essa estratégia obteve 90.7% de sensibilidade e 50.5% de especificidade na detecção de NIC2+.

Tabela 11 – Desempenho entre as diferentes estratégias simuladas utilizando-se HPV e metilação e tendo como referência o emprego isolado de HPV+ na detecção de NIC2+.

#	Descrição da Estratégia (Rastreamento Positivo)	(N)	Colposcopia (n)	NIC2+ (n)	Razão NIC2+	Razão Colposcopia	S	E
Estratégias baseadas em testes isolados								
5 ⁽¹⁾	HPV isolado (HPV+)	317	192	88	1,00	1,00	90,7	50,5
40'	has-miR-124-2+ isolado	317	175	85	0,96	0,91	87,6	59,1
41'	LMX1A+ isolado	317	67	46	0,52	0,35	47,4 [↓]	90,5 [↑]
42'	SOX1+ isolado	317	110	64	0,73	0,57	66,0 [↓]	79,1 [↑]
43'	TERT+ isolado	317	118	64	0,73	0,61	66,0 [↓]	75,5 [↑]
Estratégias baseadas em cotestes								
45'	HPV+ ou has-miR-124-2+	317	243	95	1,08	1,26	97,9 [↑]	32,7 [↓]
46'	HPV+ ou LMX1A+	317	204	91	1,03	1,06	93,8	48,6
47'	HPV+ ou SOX1+	317	218	93	1,05	1,13	95,9	43,2 [↓]
48'	HPV+ ou TERT+	317	223	92	1,04	1,16	94,8	40,5 [↓]
Estratégias baseadas em testes reflexos								
80'	HPV+ e metilação reflexa (has-miR-124-2+)	317	129	78	0,88	0,67	80,4 [↓]	76,8 [↑]
81'	HPV+ e metilação reflexa LMX1A+	317	60	43	0,49	0,31	44,3 [↓]	92,3 [↑]
82'	HPV+ e metilação reflexa SOX1+	317	89	59	0,67	0,46	60,8 [↓]	86,4 [↑]
83'	HPV+ e metilação reflexa TERT+	317	92	60	0,68	0,48	61,9 [↓]	85,5 [↑]
95'	HPV+ e metilação reflexa has-miR-124-2+ entre HPV não16/18+	316	153	81	0,92	0,80	84,4 [↓]	67,3 [↑]
96'	HPV+ e metilação reflexa LMX1A+ entre HPV16/18+	316	108	62	0,70	0,56	64,6 [↓]	79,1 [↑]
97'	HPV+ e metilação reflexa SOX1+ entre HPV16/18+	316	130	70	0,79	0,68	72,9 [↓]	72,7 [↑]
98'	HPV+ e metilação reflexa TERT+ entre HPV16/18+	316	124	68	0,77	0,65	74,5 [↓]	74,5 [↑]

NIC2+: lesão intraepitelial cervical grau 2 ou mais grave. S: sensibilidade. E: especificidade. HPV: Papilomavírus Humano. HPV16/18: Papilomavírus Humano genótipos 16 e/ou 18.

(¹) Estratégia adota como referência para critérios de comparação que consideraria positivo o rastreamento de mulheres com HPV+ independentemente do tipo viral.

(^{↑↓}) Diferença significativa do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste de McNemar em relação a estratégia de referência adotada.

Considerando-se o uso de testes isolados para a detecção de NIC2+ e tendo-se como referência a estratégia 5' (HPV isolado) verificou-se taxas semelhantes de sensibilidade (87.6%) e especificidade (59.1%) para o emprego da metilação do gene hsa-miR-124-2 e decréscimo de 9% no encaminhamento para colposcopia.

Os demais marcadores com metilação dos genes LMX1A, SOX1 e TERT apresentaram sensibilidade respectivamente de 47.4%, 66.0% e 66.0% que foram significativamente menores que as estratégias 5' e 40' ($p < 0.05$). A estratégia 41' que previa o emprego do gene LMX1A metilado como marcador de lesões cervicais apresentou a mais alta especificidade entre os testes isolados (90.5%) com alto valor preditivo positivo, porém com índices limitantes de falso-negativo.

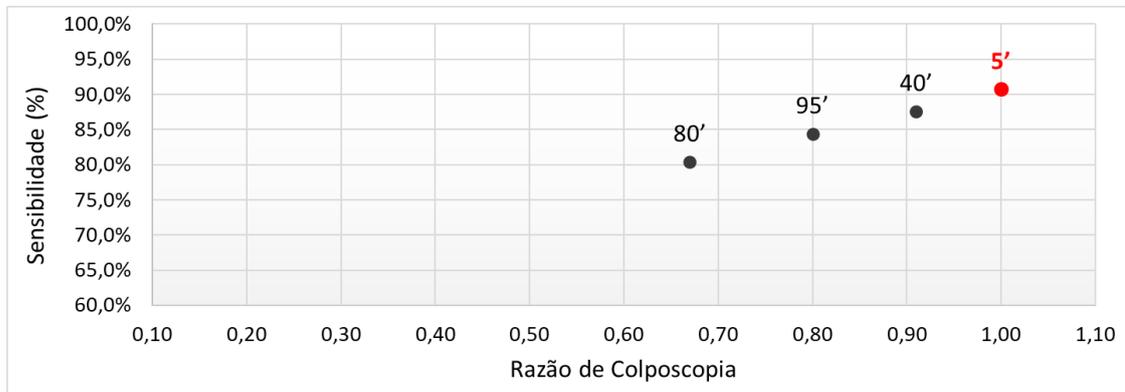
As estratégias que combinaram simultaneamente os testes de HPV e metilação dos genes demonstraram as maiores taxas de sensibilidade na detecção de NIC2+. A associação do HPV e metilação do hsa-miR-124-2 (estratégia 45') demonstrou a maior sensibilidade (97.9%) entre todas as 17 estratégias simuladas tendo identificado 95 dos 97 casos de NIC2+. Entretanto, essa estratégia também demonstrou a menor especificidade com aumento de 26% da demanda por colposcopia quando comparado a estratégia 5' (HPV isolado).

Considerando-se as estratégias que simularam a aplicação de testes de metilação após a triagem inicial por HPV verificou-se maiores taxas de especificidade e consequente redução na demanda por colposcopias em todos os modelos propostos quando comparados a estratégia 5'.

As taxas de especificidade variaram de 67.3% (95') a 92,3% (81'). A estratégia que propõe a aplicação do teste de metilação do gene hsa-miR-124-2 entre as mulheres com HPV não 16/18 positivo (95') demonstrou maior sensibilidade (84.4%) entre os modelos propostos com testes sequenciais. Comparativamente ao emprego isolado do teste de HPV isso significou uma queda de sensibilidade da ordem de 6.3%, contudo com especificidade significativamente maior de 67.3% e redução de 20% na necessidade de exames colposcópicos.

Na figura 16 estão destacadas as três estratégias que demonstraram desempenho semelhante em termos de sensibilidade com a estratégia de referência adotada (HPV+) com taxas acima de 80%, porém com razão de colposcopia inferior a 1,0 o que equivale a menor

demanda de exames complementares e maior especificidade quando comparadas a estratégia 5'.



(Estratégia #5') HPV Isalado (HPV+) - Referência
 (Estratégia #40') has-miR-124-2+ isolado
 (Estratégia #80') HPV+ e metilação reflexa (has-miR-124-2+)
 (Estratégia #95') HPV+ e metilação reflexa has-miR-124-2+ entre HPV não16/18+

Figura 16 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 80% e razão de colposcopia menor que 1,0).

HPV: Papilomavírus Humano

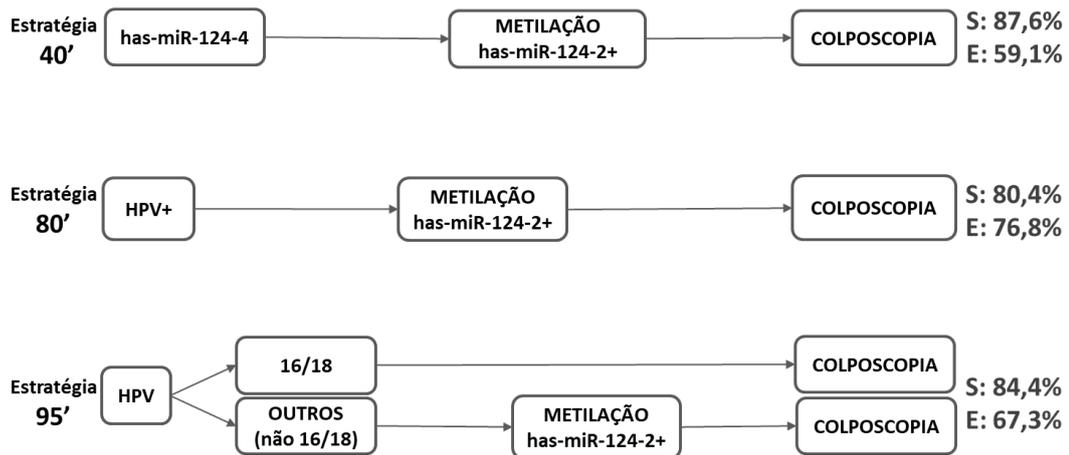


Figura 16 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 80% e razão de colposcopia menor que 1,0).

HPV: Papilomavírus Humano

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Associação de citologia e HPV na detecção de NIC2+

A persistência de indicadores desfavoráveis de incidência e mortalidade relacionados ao câncer do colo do útero em todo o mundo¹ justificam os esforços em ampliar as ferramentas diagnósticas que possam representar melhoria no desempenho dos programas de rastreamento populacional. As iniciativas que incorporaram a vacinação contra HPV em diversos países nos últimos anos sinalizam para um futuro promissor na redução do câncer cervical, porém carecem de tempo e garantia de abrangência adequadas⁸⁵.

A prevenção secundária configura ainda ação primordial e como tal deve ser aprimorada sobretudo nas regiões de baixa e média renda que rotineiramente são as mais impactadas pelo câncer do colo uterino. Diversos fatores podem contribuir para o sucesso a longo prazo dos programas populacionais de rastreio dentre eles a oferta de testes que possam ser empregados em larga escala com resultados robustos em termos de acurácia, segurança, aceitação, custos e reprodutibilidade.

Embora os testes citológicos perfaçam ainda a primeira escolha no rastreamento das lesões precursoras e do câncer do colo do útero entre diferentes países e por vários motivos, diversos programas de rastreamento têm proposto a incorporação do teste de HPV em suas diretrizes com o objetivo de complementar ou mesmo substituir o uso da citologia⁴⁴. Essa iniciativa se justifica pelas limitações do teste de Papanicolaou que em diferentes revisões demonstra grandes variações nas taxas de sensibilidade^{22, 23}.

Certamente vários desafios devem ser superados para a introdução do teste do HPV no rastreio do câncer do colo do útero, sobretudo nos países em desenvolvimento, que estão sujeitos às maiores taxas de incidência e mortalidade^{86, 87} e invariavelmente possuem programas de rastreamento desarticulados com limitações orçamentárias e dificuldades em se garantir cobertura adequada da população-alvo⁸⁸, repetição dos exames em períodos oportunos e investigação complementar dos casos suspeitos.

Não foi objetivo desse estudo a análise de custo-efetividade, entretanto, algumas pesquisas apontam o maior custo dos testes moleculares de HPV em comparação à citologia

como barreira adicional à sua utilização⁸⁹, o que não necessariamente significaria uma relação custo-efetividade desfavorável principalmente quando empenhados em larga escala^{90, 91}. Além disso, o emprego do HPV como teste de rastreio possibilitaria ampliar os intervalos de repetição dos testes quando negativos e reduziria a quantidade de profissionais envolvidos nas análises laboratoriais pela introdução de processos automatizados.

Outra importante vantagem conferida pelos testes de HPV é o aumento considerável nas taxas de sensibilidade e valor preditivo negativo⁹². No entanto, há limitações na especificidade do método, mais evidente em mulheres jovens, que indicam para a necessidade do uso de exames de triagem adicionais para os casos testados positivos para o HPV.

Outra possível consequência induzida pela limitação da especificidade seria uma virtual sobrecarga aos serviços de colposcopia e elevação nas taxas de exames falso-positivos com procedimentos terapêuticos desnecessários^{93, 94}. Soma-se a isso a necessidade de se considerar as questões emocionais com diferentes impactos comportamentais advindas de testagens positivas para o HPV potencializado pelo desconhecimento da população sobre esse tema específico⁹⁵.

Para o Brasil especificamente, após revisão na literatura, não foram encontrados indicadores precisos sobre a disponibilidade e cobertura nacional de serviços ou profissionais especializados em colposcopia. Estimativas apontam que cerca de 4,8% das mulheres rastreadas por citologia necessitarão de exames colposcópicos de diagnóstico ou seguimento pós tratamento⁹⁶, contudo, diante da heterogeneidade na estruturação da saúde pública em todo o território nacional, acredita-se em potencial deficiência na oferta desses serviços. Essas possíveis desigualdades no acesso a colposcopia poderiam representar entrave à introdução de estratégias de rastreio baseadas em testes de HPV (isolados ou em associação a exames citológicos) pelo acréscimo natural na demanda por esse tipo de exame.

Semelhantemente ao demonstrado nesse estudo, outras pesquisas compararam algoritmos de rastreamento de NIC2+ avaliando-se o emprego isolado do teste de HPV (com ou sem genotipagem) ou em associação a citologia. No presente estudo, os algoritmos que previam a triagem por meio de citologia isolada apresentaram sensibilidade que oscilou de

43,1% (estratégia 4, LIEAG+) a 90,3% (estratégia 1, ASC-US+). Embora a estratégia 1 (ASC-US+) apresente alta sensibilidade, há barreiras à sua aplicação uma vez que ocasionou incremento de 80% na demanda por exames colposcópicos quando comparada à estratégia 3 (ASC-H+) de referência.

Embora a população avaliada nesse estudo tenha sido previamente triada por testes alterados de citologia e conseqüentemente apresente uma maior prevalência de lesões NIC2+ quando comparado à população geral, isso não representa viés aos resultados que avaliaram comparativamente a acurácia das diferentes estratégias na mesma população.

Especificamente na população analisada 181 mulheres foram classificadas com atipias citológicas de LIEBG (90) e ASC-US (91) o que representou 19,9% do total (181/907). Considerando-se que a população desse estudo é composta por mulheres previamente testadas positivas pelo Papanicolaou é evidente que essa proporção está aumentada e não condiz com os índices verificados em populações gerais submetidas ao rastreamento.

Levantamento baseado em banco de dados nacional do Siscolo (Brasil) no período de 2011-2013 entre usuárias de 25-64 anos de idade estimou em 2,8% a proporção de mulheres com citologia de ASC-US/LIEBG. Desse total cerca de 20,9% apresentariam persistência de atipias após repetição do teste citológico o que significa afirmar que do total de mulheres rastreadas 0,6% seriam encaminhadas para colposcopia entre o grupo com diagnóstico de ASC-US/LIEBG após persistência⁹⁶.

Uma limitação desse estudo se deve à análise transversal dos dados, o que impossibilitou o seguimento dos casos que, de acordo com as Diretrizes Brasileiras²¹, necessitariam de repetição da citologia. Isso porque, segundo essas orientações, além das pacientes com citologia ASCH+, há que se encaminhar também para colposcopia as mulheres que tenham mantido exames alterados após resultados prévios de ASC-US ou LIEBG. Ao se considerar para critério de simulação das estratégias apenas o teste citológico coletado durante a colposcopia não se pode prever por esse estudo a participação do grupo de mulheres com testes de ASCU-US/LIEBG que persistissem alterados. Essa limitação ficou restrita a estratégia de referência adotada (estratégia 3) para critérios de comparação das razões de NIC2+ e colposcopia.

Vale ressaltar ainda uma crítica recorrente a esse tipo de manejo, que prevê repetições de testes citológicos, baseada no fato de que um número significativo de mulheres brasileiras não obedece aos prazos estipulados de repetição dos testes o que acarreta distorções com grupos não rastreados e outros com excesso de testes desnecessários⁹⁷. Dessa forma, a possibilidade de modelos que definam ou não a necessidade de colposcopia baseando-se em exames obtidos em um único momento seria valioso.

A figura 12 já mencionada na sessão resultados, engloba as estratégias testadas (citologia + HPV) que conferiram aumento significativo na sensibilidade do rastreio de NIC2+ à custa de elevação de até 50% na demanda por colposcopia quando comparadas a estratégia 3 (ASC-H+) de referência. Optou-se por destacar essas propostas de detecção de NIC2+ por entendermos que contribuem para amenizar as limitações em termos de sensibilidade do emprego de citologia isolada sendo fixado em 50% o acréscimo na demanda por colposcopias que nos pareceu razoável para a transposição em um cenário real de rastreamento.

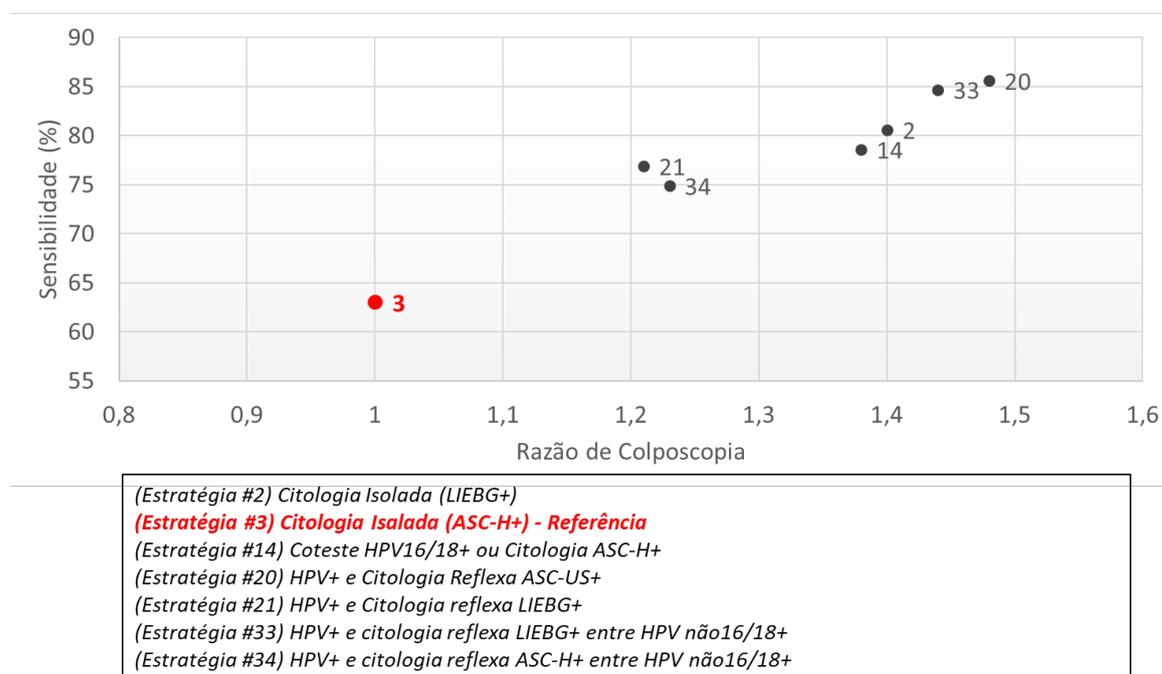


Figura 12 - Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 63,0% e razão de colposcopia de até 1,5).

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau; HPV: Papilomavírus Humano.

Uma alternativa, levando-se em consideração a inabilidade na gestão do programa de rastreio no Brasil em controlar os prazos adequados de repetição dos exames, seria a estratégia 2 (figura 17) que referenciaria imediatamente para colposcopia as mulheres com resultados de LIEBG ou mais graves (LIEBG+). Essa estratégia deve ser considerada uma vez que elevou significativamente a acurácia na detecção de NIC2+ (sensibilidade de 80,6%) com aumento de 40% na demanda por colposcopia.

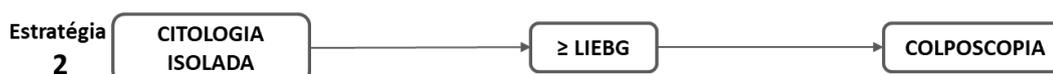


Figura 17 – Fluxograma representativo da estratégia número 2.

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau.

Chatzistamatiou et al. avaliaram os dados de mulheres europeias de 25 a 55 anos que participaram do estudo “HERMES” (*HElIenic Real Life Multicentric Cervical Screening*) e também simularam diferentes estratégias de rastreio de lesões cervicais⁹⁸. O estudo europeu, assim como o nosso, demonstrou altas taxas de sensibilidade na detecção de NIC2+ em algoritmos que orientam a realização de colposcopia para todas as mulheres com testes positivos para HPV-AR, evidentemente com sobrecarga na demanda por exames complementares que no nosso estudo representou aumento de 107%.

Embora o teste de HPV isoladamente aumente o número de colposcopias como mencionado, o exame molecular acaba por homogeneizar a qualidade das análises, evitando que o modelo atual, baseado em citologia, traga como variável permissiva a heterogênea qualidade dos exames citológicos. Em cenários onde a rastreabilidade e a aderência das mulheres ao rastreio mostram-se irregulares, a possibilidade de ter-se um teste com tais características poderia contribuir para reduzir essas inequidades do sistema.

A estratégia 20 (figura 18) com rastreio por HPV e citologia reflexa para os casos positivos e referenciamento para colposcopia daqueles casos com resultados anormais (ASC-US+) elevou em 36% a detecção de NIC2+ com aumento de 48% na colposcopia. Comparativamente, essa estratégia não obteve desempenho significativamente superior ao uso isolado de citologia (LIEBG+) simulado pela estratégia 2 tendo exigido aumento maior na demanda por exames colposcópicos (48% versus 40% na estratégia 2).



Figura 18 – Fluxograma representativo da estratégia número 20.

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; HPV: Papilomavírus Humano.

Ao se considerar a possibilidade de genotipagem dos tipos virais, a estratégia 32 (figura 19) que empregaria citologia reflexa (ASC-US+) apenas para as mulheres com infecção pelos tipos não 16/18 elevaria a sensibilidade em 40% com desempenho bastante promissor assim como demonstrado por outros estudos^{93, 98, 99} com elevação da ordem de 63% na necessidade de colposcopias. Essa estratégia simula um dos modelos propostos pelo ATHENA HPV Study e que foi considerado apropriado para o rastreamento primário de câncer cervical nos Estados Unidos com o emprego do Cobas HPV test³⁶.

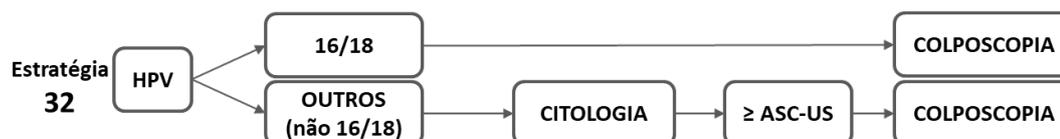


Figura 19 – Fluxograma representativo da estratégia número 32.

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; HPV: Papilomavírus Humano.

Isidean et al.⁹⁹, em estudo conduzido no Canadá, ao compararem o desempenho da estratégia de rastreamento de NIC2+ que refere para colposcopia mulheres com testes positivos para HPV16/18 e com citologia reflexa ASC-US+ entre as mulheres com HPV+ não 16/18 obtiveram sensibilidade de 82,5%, bastante próxima à taxa de 88,8% verificada no nosso estudo pela estratégia 32.

Já a estratégia número 33 (figura 20) simulada por nós que utilizaria o teste de HPV como rastreamento primário e posterior citologia entre os casos testados positivos para os tipos não 16/18, mas considerando o ponto de corte os laudos com LIEBG+, demonstrou aumento na sensibilidade (S=84,7%) assim como o modelo 32 usualmente mais difundido, porém com melhor especificidade e menor impacto na demanda por colposcopia tornando-se assim possibilidade atraente quando se avalia o uso de testes sequenciais.

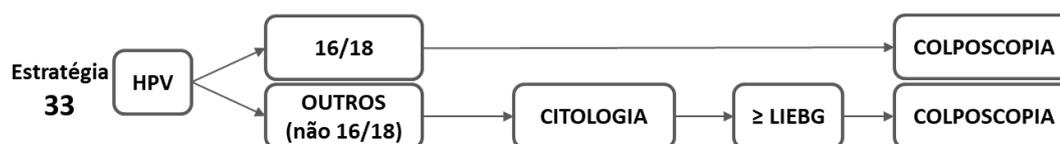


Figura 20 – Fluxograma representativo da estratégia número 33.

LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; HPV: Papilomavírus Humano.

Naturalmente, modelos que simulem a associação em cotestes da citologia com o HPV tendem a apresentar maiores taxas de sensibilidade e diminuição da especificidade com extrapolação da razão de colposcopia. A estratégia 14 (figura 21) que indica a realização de ambos os testes em paralelo e encaminharia para colposcopia resultados de ASC-H+ ou HPV16/18+ conferiu aumento de 24% na sensibilidade e entre as alternativas com coteste foi a que apresentou crescimento mais razoável (38%) na necessidade de colposcopia.



Figura 21 – Fluxograma representativo da estratégia número 14.

ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau; HPV: Papilomavírus Humano.

A adoção de modelos que prevejam oferecer dois diferentes testes simultaneamente para o rastreio de cada indivíduo, como ocorre na estratégia 14, é esperado que se verifique elevação dos custos. Entretanto, como já mencionado, não se buscou nesse estudo aferir comparativamente o impacto dessas mudanças em termos financeiros.

Associação de citologia, HPV e metilação na detecção de NIC2+

As vantagens do teste de HPV que incluem aumento considerável na taxa de sensibilidade e no valor preditivo negativo permitindo intervalos maiores entre os testes de triagem⁹² e automação nos processos laboratoriais são valiosas. No entanto, a especificidade limitada desse método, especialmente entre mulheres mais jovens, aponta invariavelmente para a necessidade de realização de testes adicionais para definição dos casos a serem referenciados para colposcopia após um teste de HPV positivo. A associação de testes mais

específicos ao HPV visa reduzir a taxa de resultados falso-positivos e procedimentos diagnósticos e terapêuticos desnecessários^{93, 94}.

Semelhantemente a este estudo, outros pesquisadores têm sugerido novos algoritmos para a detecção de NIC2+ que utilizam o teste de HPV isolado (com ou sem genotipagem) ou combinado a outros exames, sejam eles citológicos, moleculares, genéticos ou imunocitoquímicos. Mais comumente as pesquisas têm associado a citologia como teste reflexo após o rastreamento primário pelo HPV.

Com base nos dados coletados no estudo ATHENA, que envolveu mais de 34.000 mulheres com idade superior a 30 anos submetidas à citologia e ao teste de HPV, Cox et al.¹⁰⁰ simularam 10 diferentes estratégias de rastreamento e concluíram que o emprego da citologia como teste reflexo associada a genotipagem do HPV confere aumento na especificidade e diminuem possíveis danos secundários a colposcopias e biópsias desnecessárias.

Além disso, propostas de modelos de rastreamento que excluem os testes citológicos têm ganhado espaço pelas limitações do Papanicolaou que é examinador dependente e sofre influência direta da experiência dos profissionais responsáveis pela avaliação laboratorial, além das dificuldades de reprodutibilidade e produção em larga escala.

As estratégias simuladas que utilizaram os testes automatizados para pesquisa de HPV de alto risco e hipermetilação dos genes hsa-miR-124-2, LMX1A, SOX1 e TERT foram selecionados por se mostrarem promissores como marcadores de lesões intraepiteliais de alto grau e câncer em estudo prévio publicado pelo mesmo grupo de pesquisadores⁷⁹. Estudo esse que concluiu que a hipermetilação dos genes hsa-miR-124-2, SOX-1, TERT e LMX1A pode ser considerada como marcador isolado para o diagnóstico de lesões cervicais independentemente do status de infecção pelo HPV sugerindo novas pesquisas que possam detalhar modelos mais apropriados de rastreamento incluindo esses novos testes.

Semelhantemente ao demonstrado para as estratégias que simularam o emprego de citologia e HPV, na figura 14 também estão em destaque as estratégias utilizando testes de metilação que obtiveram desempenho em termos de sensibilidade superior à estratégia 3 de referência e com aumento de até 50% na demanda por exames colposcópicos. Vale reafirmar que os testes de metilação foram empregados em subgrupo da população de estudo e que especificamente para essa amostra a sensibilidade da estratégia 3 (ASC-H+) foi de 60,8%.

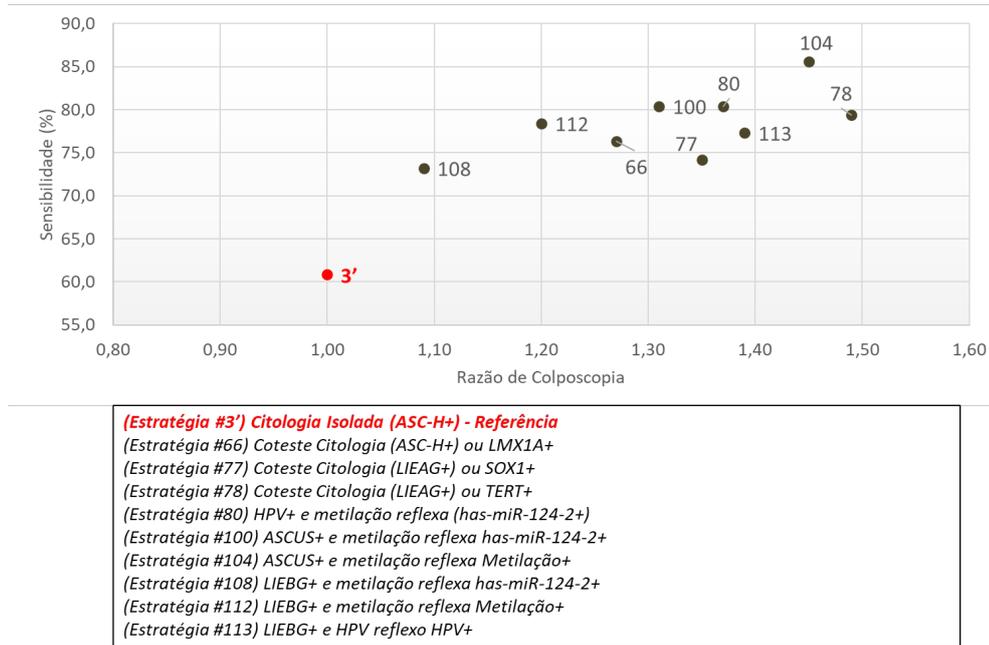


Figura 14 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados, cotestes e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de coloscopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 60,8% e razão de coloscopia de até 1,5).

HPV: Papilomavírus Humano; LIEBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIEAG: lesão intraepitelial de alto grau; ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau.

Ao se associar o Papanicolaou com os testes de metilação obtivemos maiores taxas de sensibilidade na detecção de NIC2+ pela estratégia número 104 (figura 22). Esse modelo obteve 85,6% de sensibilidade com diferença significativa em relação a triagem por ASC-H+ e propôs a testagem do perfil de metilação dos 4 genes (hsa-miR-124-2, LMX1A, SOX1, TERT) para todas as mulheres que apresentassem primariamente uma citologia alterada (ASC-US+). O aumento na demanda de coloscopias seria da ordem de 45%.

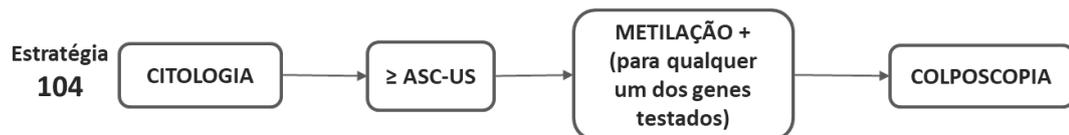


Figura 22 – Fluxograma representativo da estratégia número 104.

ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; HPV: Papilomavírus Humano.

Apesar do desempenho destacado da estratégia 104 com maiores índices de sensibilidade verificou-se que isoladamente a presença de hipermetilação do gene hsa-miR-124-2 foi verificada na quase totalidade dos casos e que esse gene por si só já garantiria resultados similares e com possibilidade de redução de custos. O emprego isolado da metilação do hsa-miR-124-2 está descrito pela estratégia 100 (figura 23) e obteve sensibilidade de 80,4% e razão de colposcopia de 1,31 quando comparado a estratégia referência (ASC-H+)



Figura 23 – Fluxograma representativo da estratégia número 100.

ASC-H: células escamosas atípicas de significado indeterminado, não podendo afastar lesão de alto grau; HPV: Papilomavírus Humano.

Associação de HPV e metilação na detecção de NIC2+

Conforme demonstrado na associação com a citologia, a metilação do gene hsa-miR-124-2 comparativamente aos demais genes testados obteve melhor desempenho em prever a presença de lesões significativas com resultados semelhantes ao observado por outros estudos¹⁰¹⁻¹⁰³. Agora, considerando-se o emprego apenas de testes moleculares tanto o HPV quanto a metilação de hsa-miR-124-2 apresentaram sensibilidade semelhante para detecção de NIC2+ (90.7% e 87.6% respectivamente) mesmo quando utilizados como testes primários.

Entretanto, a razão de colposcopia demonstrou que o emprego do teste de metilação do gene has-miR-124-2 (estratégia 40') reduziria em 9% a demanda por colposcopias comparado à estratégia com HPV isolado. Espera-se que os testes genéticos tenham maior potencial de aplicação em mulheres previamente positivas para HPV, no entanto, esses resultados podem indicar para a possibilidade de utilização da hipermetilação como testes primários de rastreio.

Os demais genes avaliados LMX1A, SOX1 e TERT não obtiveram o mesmo desempenho levando-se em consideração o perfil de metilação e demonstraram menores taxas de

sensibilidade para a detecção de NIC2+ seja isoladamente ou em estratégias de testes sequenciais em mulheres HPV positivas. Mesmo em cenários que simularam a proposta de coteste com HPV a metilação desses genes não conferiu vantagem como marcador quando comparado ao uso isolado do teste de HPV.

A associação simultânea dos testes de HPV e hsa-miR-124-2 metilado como coteste (estratégia 45') aumentou significativamente a sensibilidade na triagem de lesões NIC2+ porém com redução da especificidade também significativa quando comparado ao emprego isolado do HPV. Além disso, há que se levar em consideração possíveis impactos orçamentários em estratégias que orientem testes simultâneos no rastreo populacional sendo necessários estudos específicos de custo-efetividade.

Considerando-se que o modelo ideal para o rastreo do câncer do colo do útero inclua testes de alta sensibilidade para minimizar os casos falso-negativos e alta especificidade para evitar exames diagnósticos desnecessários e sobretratamento, as estratégias com coteste (45'-48'), apesar de alta sensibilidade, gerariam aumento dos casos falso-positivos e incremento de 6% a 26% na necessidade de colposcopia quando comparadas a estratégia 5'.

Habitualmente, as taxas de sensibilidade quando se trata de estratégias de rastreamento são inversamente proporcionais aos índices de especificidade o que indica a importância de se considerar modelos intermediários com boa sensibilidade e especificidade razoável. A Figura 24 confirma essa tendência também em relação aos modelos aqui simulados.

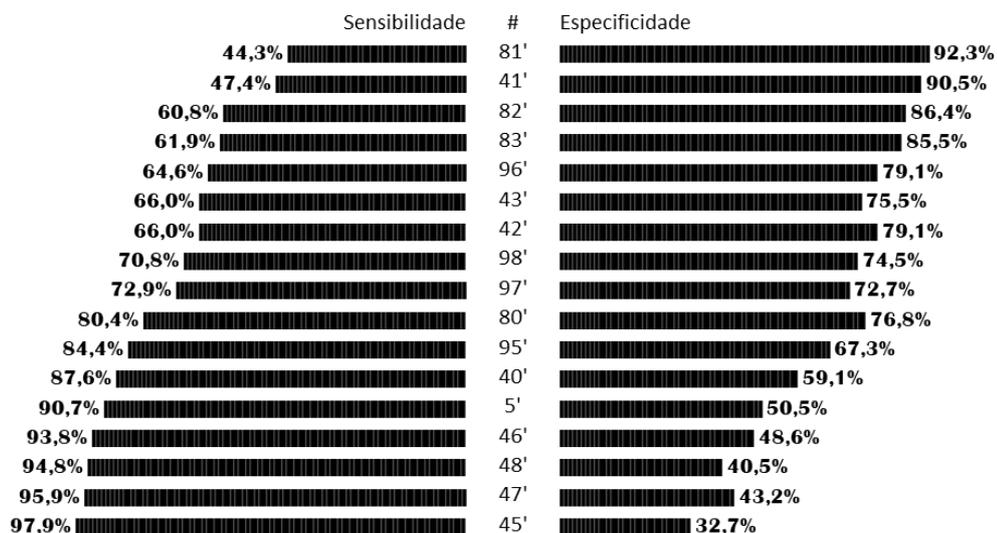
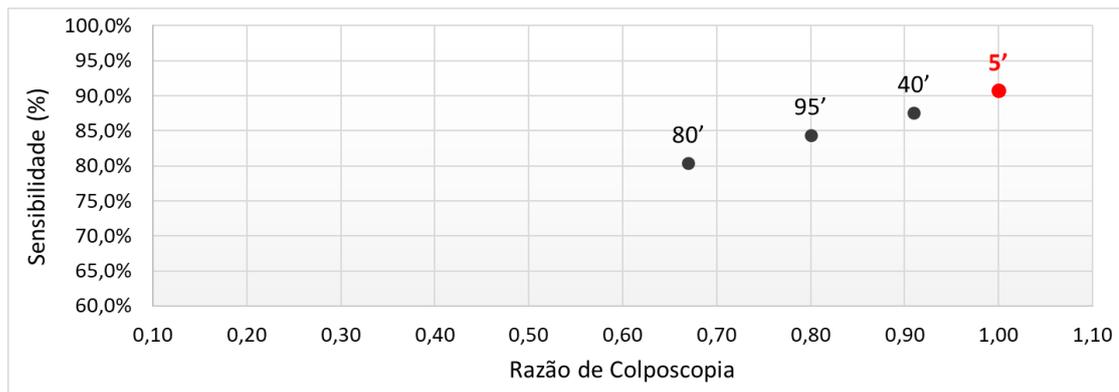


Figura 24 – Esquematização das taxas de sensibilidade e especificidade das 17 estratégias simuladas para detecção de NIC2+ considerando-se os testes de HPV e metilação.

Na figura 17 estão destacadas as estratégias que atingiram taxas de sensibilidade superiores a 80% e ainda assim menores que a estratégia 5' (HPV+ isoladamente) mas que garantiram maior especificidade e razão de colposcopia <1,0.



(Estratégia #5') HPV Isolado (HPV+) - Referência
(Estratégia #40') has-miR-124-2+ isolado
(Estratégia #80') HPV+ e metilação reflexa (has-miR-124-2+)
(Estratégia #95') HPV+ e metilação reflexa has-miR-124-2+ entre HPV não16/18+

Figura 17 – Sensibilidade das diferentes estratégias simuladas (testes isolados e reflexo) para detecção de NIC2+ e o número de colposcopias necessárias (considerando estratégias com sensibilidade > 80% e razão de colposcopia menor que 1,0).

HPV: Papilomavírus Humano

As estratégias 80' e 14' preveem a pesquisa de metilação do gene hsa-miR-124-2 como teste reflexo apenas entre mulheres testadas positivamente para HPV-AR. A diferença entre as duas estratégias está no emprego da genotipagem do tipo viral. Na estratégia 80' (figura 25) todas as mulheres com testes positivos para HPV seriam submetidas a pesquisa de hsa-miR-124-2 metilado e os casos positivos seriam referenciados para colposcopia enquanto que na estratégia 95' (figura 26) apenas as mulheres positivas para HPV não 16/18 teriam suas amostras investigadas para o teste de metilação. Os casos positivos para hipermetilação a as mulheres com HPV 16/18 seriam encaminhadas para colposcopia.

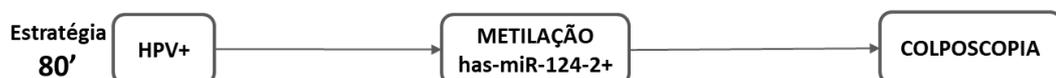


Figura 25 – Fluxograma representativo da estratégia número 80'.

HPV: Papilomavírus Humano.



Figura 26 – Fluxograma representativo da estratégia número 95’.

HPV: Papilomavírus Humano.

Ambos os modelos, tanto da estratégia 80’ quanto da 95’, apresentam como maior benefício em relação a estratégia 5’ (HPV isolados sem genotipagem) a redução do contingente de mulheres encaminhadas para exame colposcópico que reduziria em 33% na estratégia 80’ e 20% com a implementação da estratégia 95’.

Configura ainda vantagem adicional do uso dos testes de HPV e metilação em estratégias de rastreio a possibilidade de única amostragem não sendo necessárias reconvocações para novas coletas. Além disso, pode-se considerar para ambos os testes a obtenção de amostras auto coletadas. Porém, é importante ressaltar que as características que conferem maior objetividade e aplicabilidade aos testes de metilação em relação a citologia são relevantes, mas dependem de investimentos e refinamento que possam garantir automação nos processos prevendo seu uso em larga escala.

Evidentemente são necessárias investigações adicionais que possam medir comparativamente o desempenho de todas essas estratégias num cenário real de rastreamento populacional considerando-se que esse estudo se baseou numa coorte de mulheres previamente triadas por citologias alteradas. Outros marcadores envolvidos na carcinogênese do câncer cervical ainda carecem de exploração mais aprofundada que possa elucidar seu papel como possíveis testes de triagem populacional.

Diante das alegações expressas, destaca-se que esse estudo lança luz sobre possíveis novas combinações de testes que de forma clara demonstram aumento na sensibilidade em detectar lesões precursoras e o câncer do colo uterino quando comparadas ao modelo tradicional baseado no Papanicolaou. Algumas estratégias simuladas conferiram ganho na acurácia sem, contudo, representar aumento demasiado no número de mulheres que passarão a necessitar de exames complementares de colposcopia.

Destaca-se a possibilidade mostrada pela estratégia 2 que considerou encaminhar para colposcopia todas as mulheres com idade de 25-69 anos após uma única testagem citológica com resultado de LIEBG ou pior. Esse modelo já garantiria acréscimo de 28% na detecção de NIC2+ sem considerar introdução de outros testes diferentes do Papanicolaou no rastreio populacional e com impacto de 40% nos encaminhamentos para colposcopia.

Considerando-se a possibilidade de uso dos testes de HPV constatou-se frequentemente maiores taxas de sensibilidade quando comparado ao desempenho das estratégias que previam citologia apenas. No entanto, há que se considerar as limitações em termos de especificidade do método o que foram explicitadas pela estratégia 5 ao definir elevação da ordem de 107% na demanda por colposcopias quando se propôs o emprego de HPV isolado sem genotipagem. Por outro lado, a estratégia 33 consegue minimizar a perda de especificidade e garantir sensibilidade de 84,7% ao propor o uso de citologia reflexa (LIEBG+) apenas entre os testes positivos para HPV não 16/18. Esse tipo de desenho que associa testes iniciais mais sensíveis com exames de triagem mais específicos aqui também nos pareceu mais adequado.

Entre os genes pesquisados para a presença de sítios de hipermetilação o hsa-miR-124-2 apresentou melhor desempenho tanto isoladamente quanto em associação nas estratégias que previam coteste ou testes reflexos. Vale salientar que não houve diferença significativa na sensibilidade em detectar NIC2+ quando se comparou o uso isolado de HPV (sem genotipagem) e a metilação de hsa-miR-124-2 com ganho de especificidade para o segundo. Ademais, a possibilidade que empregar a pesquisa de metilação especificamente desse gene como teste reflexo após triagem inicial por HPV-AR positivo descortina nova proposta de rastreio e deve ser alvo de outras investigações.

Não há dúvidas da necessidade de se aprimorar os modelos de rastreamento do câncer do colo uterino existentes. Decisões de mudanças de conduta naturalmente devem ser permeadas por questões de custo e serem avaliadas por esferas do poder público em conjunto com setores da ciência e segmentos outros da sociedade. Há que se considerar ainda diferenças regionais e a possibilidade de implantação de propostas distintas, individualizadas para cada cenário considerando a magnitude e heterogeneidade de um país como o Brasil.

Investimentos devem ser orientados para a organização dos processos, para a garantia de qualidade nas diversas etapas, mas também na introdução de novos testes que possam aprimorar a acurácia dos modelos já existentes. Esse estudo sinaliza para possibilidades a serem implementadas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Considerando-se o objetivo de simular diferentes estratégias para detecção de NIC2+ associando testes citológicos, HPV e de metilação de genes verificou-se que:

A) prevendo o emprego isolado de citologia, a estratégia que considerou resultados de LIEBG ou pior como rastreio positivo conferiu aumento de sensibilidade com acréscimo de 40% na demanda por colposcopias;

B) as estratégias que simularam o uso de testes de HPV sem genotipagem em modelos isolados ou em coteste apresentaram as maiores taxas de sensibilidade em prever lesões NIC2+;

C) utilizando-se a associação de testes de HPV e citológicos em modelos de exames reflexos obtiveram melhor desempenho as combinações que indicaram: primeiro, citologia (ASC-US+) entre as mulheres testadas positivamente para HPV sem genotipagem e segundo, citologia (LIEBG+) entre as mulheres testadas positivamente para HPV dos tipos não 16/18;

D) especificamente para os modelos que detalharam o uso de testes de metilação identificou-se melhor desempenho como marcador de lesões NIC2+ do gene hsa-miR-124-2 tanto isoladamente como em combinação com HPV quando empregado entre mulheres testadas positivamente para HPV dos tipos não 16/18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. **Int J Cancer**. 2010;127(12):2893-917.
3. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância, editor. **Rio de Janeiro: INCA; 2018**.
4. Gonzaga CMR, Freitas-Junior R, Barbaresco AA, Martins E, Bernardes BT, Resende APM. *Cervical cancer mortality trends in Brazil: 1980-2009*. **Cad Saude Publica**. 2013;29(3):599-608.
5. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Atlas de Mortalidade por Câncer*. [Internet] Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2012 [cited 11/12/2013]; Available from: <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo03.action>.
6. Sankaranarayanan R, Budukh AM, Rajkumar R. *Effective screening programmes for cervical cancer in low-and middle-income developing countries*. **Bull World Health Organ**. 2001;79(10):954-62.
7. Oliveira NPD, Santos Siqueira CAD, Lima KYN, de Camargo Cancela M, Souza DLB. *Association of cervical and breast cancer mortality with socioeconomic indicators and availability of health services*. **Cancer Epidemiol**. 2019;64:101660.
8. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. *Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection*. **Vaccine**. 2006;24:S52-S61.
9. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. *Prevalence of HPV infection among females in the United States*. **JAMA**. 2007;297(8):813-9.
10. Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. *Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings*. **J Infect Dis**. 2010;202(12):1789-99.

11. Ayres ARG, Silva GA. *Cervical HPV infection in Brazil: systematic review*. **Rev Saude Publica**. 2010;44(5):963-74.
12. Lorenzi AT, Fregnani JHTG, Possati-Resende JC, Neto CS, Villa LL, Longatto-Filho A. *Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test*. **Gynecol Oncol**. 2013;131(1):131-4.
13. Levi JE, Martins TR, Longatto-Filho A, Cohen DD, Cury L, Fuza LM, et al. *High-Risk HPV Testing in Primary Screening for Cervical Cancer in the Public Health System, Sao Paulo, Brazil*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2019;12(8):539-46.
14. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. **N Engl J Med**. 2003;348(6):518-27.
15. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau M-C, Désy M, et al. *Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer*. **J Infect Dis**. 1999;180(5):1415-23.
16. Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu T. *Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3*. **Cancer Immunol Immunother**. 2010;59(5):799-803.
17. Sankaranarayanan R, Black RJ, Parkin DM. *Cancer survival in developing countries*. IARC Scientific Publications N°. 15. **Lyon: IARC Press; 1988**.
18. Hakama M, Miller AB, Day NE. *Screening for cancer of the uterine cervix*. IARC Scientific Publications N°. 76. **Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1986**.
19. Oke JL, O'Sullivan JW, Perera R, Nicholson BD. *The mapping of cancer incidence and mortality trends in the UK from 1980–2013 reveals a potential for overdiagnosis*. **J Scientific Reports**. 2018;8(1):14663.
20. DO INCA NER. *Periodicidade de realização do exame preventivo do câncer do colo do útero*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2002;48(1):13-5.
21. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero*. 2ª ed. Coordenação de

Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio a Organização de Rede, editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2016. 114 p.

22. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review*. **Ann Intern Med**. 2000;132(10):810-9.

23. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. *Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis*. **Obstet Gynecol**. 1998;91(4):626-31.

24. Agorastos T, Chatzistamatiou K, Katsamagkas T, Koliopoulos G, Daponte A, Constantinidis T. *Primary Screening for Cervical Cancer Based on High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Detection and HPV 16 and HPV 18 Genotyping. Comparison to Cytology* **PLoS ONE**. 2015;10(3):e0119755.

25. Allen K, Holladay EB. *Risk Management for the Cytology Laboratory*. **Raleigh, NC: American Society for Cytotechnology**; 2002.

26. Sawaya GF, Grimes DA. *New technologies in cervical cytology screening: a word of caution*. **Obstet Gynecol**. 1999;94(2):307-10.

27. Stoler MH, Schiffman M. *Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study*. **JAMA**. 2001;285(11):1500-5.

28. Rozemeijer K, Naber SK, Penning C, Overbeek LI, Looman CW, de Kok IM, et al. *Cervical cancer incidence after normal cytological sample in routine screening using SurePath, ThinPrep, and conventional cytology: population based study*. **Bmj**. 2017;356:j504.

29. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, et al. *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(3):147-72.

30. Hoda RS, Loukeris K, Abdul-Karim FW. *Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: a comprehensive review of similarities and differences*. **Diagn Cytopathol**. 2013;41(3):257-78.

31. Longatto-Filho A, Levi JE, Martins TR, Cohen D, Cury L, Villa LL, et al. *Critical Analyses of the Introduction of Liquid-Based Cytology in a Public Health Service of the State of Sao Paulo, Brazil.* **Acta Cytol.** 2015;59(3):273-7.

32. Fontaine D, Narine N, Naugler C. *Unsatisfactory rates vary between cervical cytology samples prepared using ThinPrep and SurePath platforms: a review and meta-analysis.* **BMJ Open.** 2012;2(2):e000847.

33. Biscotti CV, Dawson AE, Dziura B, Galup L, Darragh T, Rahemtulla A, et al. *Assisted primary screening using the automated ThinPrep Imaging System.* **Am J Clin Pathol.** 2005;123(2):281-7.

34. Cuzick J, Bergeron C, von Knebel Doeberitz M, Gravitt P, Jeronimo J, Lorincz AT, et al. *New Technologies and Procedures for Cervical Cancer Screening.* **Vaccine.** 2012;30, Supplement 5(0):F107-F16.

35. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, et al. *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination.* **Papillomavirus research.** 2015;1:22-31.

36. Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. *Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis.* **Obstetrics & Gynecology.** 1998;91(4):626-31.

37. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry K-U, Szarewski A, Munk C, et al. *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study.* **Bmj.** 2008;337:a1754.

38. Östör AG. *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.* **International Journal of Gynecological Pathology.** 1993;12(2):186.

39. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. *Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population.* **Br J Cancer.** 2013;108(4):908.

40. Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. *Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study.* **The Lancet.** 2003;362(9399):1871-6.

41. Wright TC, Stoler MH, Behrens CM, Sharma A, Zhang G, Wright TL. *Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test.* **Gynecologic oncology.** 2015;136(2):189-97.
42. Curry SJ, Krist AH, Owens DK, Barry MJ, Caughey AB, Davidson KW, et al. *Screening for Cervical Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement.* **JAMA.** 2018;320(7):674-86.
43. WHO. *WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention.* **Geneva: World Health Organization**
Copyright (c) World Health Organization 2013.; 2013.
44. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. *2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors.* **Obstet Gynecol.** 2013;121(4):829-46.
45. ALTS Study Group. *Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance.* **Am J Obstet Gynecol.** 2003;188:1383-92.
46. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. *Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study.* **Lancet Oncol.** 2010;11(11):1048-56.
47. de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. *Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil.* **BMC Cancer.** 2013;13(1):357.
48. Lapierre SG, Sauthier P, Mayrand M-H, Dufresne S, Petignat P, Provencher D, et al. *Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix.* **J Clin Microbiol.** 2012;50(4):1240-4.
49. Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. *High-Risk Human Papillomavirus Testing in Women With ASC-US Cytology Results From the ATHENA HPV Study.* **Am J Clin Pathol.** 2011;135(3):468-75.

50. White C, Keegan H, Pilkington L, Ruttle C, Kerr P, Sharp L, et al. *Evaluation of the Clinical Performance of the cobas 4800 HPV Test in Patients Referred for Colposcopy*. **J Clin Microbiol**. 2013;51(10):3415-7.
51. Mateos Lindemann ML, Rodriguez Dominguez MJ, Chacón de Antonio J, Sandri MT, Tricca A, Sideri M, et al. *Analytical Comparison of the cobas HPV Test with Hybrid Capture 2 for the Detection of High-Risk HPV Genotypes*. **J Mol Diagn**. 2012;14(1):65-70.
52. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. *Comparison of the hybrid capture 2 and cobas 4800 tests for detection of high-risk human papillomavirus in specimens collected in PreservCyt medium*. **J Clin Microbiol**. 2012;50(1):25-9.
53. Possati-Resende JC, de Lima Vazquez F, de Paula Pantano N, Fregnani JHTG, Mauad EC, Longatto-Filho A. *Implementation of a cervical cancer screening strategy using HPV self-sampling for women living in rural areas*. **Acta Cytol**. 2020;64(1-2):1-9.
54. Arbyn M, Verdoodt F, Snijders PJ, Verhoef VM, Suonio E, Dillner L, et al. *Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis*. **The lancet oncology**. 2014;15(2):172-83.
55. Lorincz AT. *Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation*. **Expert review of molecular diagnostics**. 2014;14(3):293-305.
56. Rowinsky EK. *Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer*. **The Oncologist**. 2003;8 Suppl 3:5-17.
57. Ferreira CG, Rocha JCCd. *Oncogenes e Genes Supressores de Tumor*. *Oncologia Molecular*. 2 ed. **São Paulo - SP: Atheneu**; 2010. p. 43-58.
58. Esteller M, Herman JG. *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. **The Journal of pathology**. 2002;196(1):1-7.
59. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. *Epigenetics in cancer*. **Carcinogenesis**. 2010;31(1):27-36.
60. Rodenhiser D, Mann M. *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. **CMAJ : Canadian Medical Association Journal**. 2006;174(3):341-8.

61. Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DS. *Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease*. **Kidney international**. 2011;79(1):23-32.
62. Portela A, Esteller M. *Epigenetic modifications and human disease*. **Nature Biotechnology**. 2010;28(10):1057-68.
63. Jones PA, Baylin SB. *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. **Nature Reviews Genetics**. 2002;3(6):415-28.
64. Baccarelli A, Bollati V. *Epigenetics and environmental chemicals*. **Current Opinion in Pediatrics**. 2009;21(2):243-51.
65. Hou L, Zhang X, Tarantini L, Nordio F, Bonzini M, Angelici L, et al. *Ambient PM exposure and DNA methylation in tumor suppressor genes: a cross-sectional study*. **Particle and Fibre Toxicology**. 2011;8:25.
66. Bastian PJ, Ellinger J, Rücker AV, Müller SC, Yegnasubramanian S, Nelson WG, et al. *CpG-insel-hypermethylierung der DNA: Perspektiven eines molekularen biomarkers für das Prostatakarzinom*. **Urologe - Ausgabe A**. 2008;47(9):1205-7.
67. Brait M, Sidransky D. *Cancer epigenetics: above and beyond*. **Toxicology Mechanisms and Methods**. 2011;21(4):275-88.
68. Hatziapostolou M, Iliopoulos D. *Epigenetic aberrations during oncogenesis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2011;68(10):1681-702.
69. Lai H-C, Lin Y-W, Huang R-L, Chung M-T, Wang H-C, Liao Y-P, et al. *Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse*. **Cancer**. 2010;116(18):4266-74.
70. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer*. **Mutation Research**. 2008;642(1-2):1-13.
71. Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS. *Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science*. **Gynecologic Oncology**. 2009;112(2):293-9.

72. Eijsink JJH, Lendvai Á, Deregowski V, Klip HG, Verpooten G, Dehaspe L, et al. *A four-gene methylation marker panel as triage test in high-risk human papillomavirus positive patients.* **International Journal of Cancer.** 2012;130(8):1861-9.
73. Snellenberg S, De Strooper LMA, Hesselink AT, Meijer CJLM, Snijders PJF, Heideman DAM, et al. *Development of a multiplex methylation-specific PCR as candidate triage test for women with an HPV-positive cervical scrape.* **BMC cancer.** 2012;12:551.
74. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam S, Cain J, et al. *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: a cancer journal for clinicians.** 2012;62(3):147-72.
75. Eijsink JJH, Yang N, Lendvai A, Klip HG, Volders HH, Buikema HJ, et al. *Detection of cervical neoplasia by DNA methylation analysis in cervico-vaginal lavages, a feasibility study.* **Gynecologic Oncology.** 2011;120(2):280-3.
76. Bierkens M, Hesselink AT, Meijer CJLM, Heideman DAM, Wisman GBA, van der Zee AGJ, et al. *CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease.* **International Journal of Cancer.** 2013;133(6):1293-9.
77. Overmeer RM, Louwers JA, Meijer CJLM, van Kemenade FJ, Hesselink AT, Daalmeijer NF, et al. *Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect (pre-)malignant cervical lesions in high-risk HPV-positive women.* **International Journal of Cancer.** 2011;129(9):2218-25.
78. Lorincz AT, Brentnall AR, Scibior-Bentkowska D, Reuter C, Banwait R, Cadman L, et al. *Validation of a DNA methylation HPV triage classifier in a screening sample.* **International Journal of Cancer.** 2016;138(11):2745-51.
79. Rogeri CD, Silveira HCS, Causin RL, Villa LL, Stein MD, de Carvalho AC, et al. *Methylation of the hsa-miR-124, SOX1, TERT, and LMX1A genes as biomarkers for precursor lesions in cervical cancer.* **Gynecol Oncol.** 2018;150(3):545-51.
80. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. *The 2001 Bethesda System.* **JAMA.** 2002;287(16):2114-9.

81. Possati-Resende JC, Vazquez FL, Biot ST, Mauad EC, Talarico T, Fregnani J, et al. *Organized Cervical Cancer Screening Program in Barretos, Brazil: Experience in 18 Municipalities of Sao Paulo State*. **Acta Cytol**. 2018;62(1):19-27.
82. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, et al. *2011 Colposcopic Terminology of the International Federation for Cervical Pathology and Colposcopy*. **Obstet Gynecol**. 2012;120(1):166-72.
83. Rogeri CD. *Perfil de metilação de genes em lesões precursoras do câncer do colo do útero*. **Dissertação**: Fundação Pio XII. Hospital de Câncer de Barretos; 2017.
84. *The GeneCards human gene database*. [Internet] Israel: Weizmann Institute of Science; 2017 [cited 03/03/2017]; Available from: <https://www.genecards.org/>.
85. Dilley S, Miller KM, Huh WK. *Human papillomavirus vaccination: Ongoing challenges and future directions*. **Gynecol Oncol**. 2019.
86. Denny L. *Control of cancer of the cervix in low-and middle-income countries*. **Annals of surgical oncology**. 2015;22(3):728-33.
87. Murillo R, Herrero R, Sierra MS, Forman D. *Cervical cancer in Central and South America: Burden of disease and status of disease control*. **Cancer Epidemiology**. 2016;44:S121-S30.
88. Costa RFA, Longatto-Filho A, Pinheiro C, Zeferino LC, Fregnani JH. *Historical analysis of the Brazilian cervical cancer screening Program from 2006 to 2013: a time for reflection*. **PLoS one**. 2015;10(9):e0138945.
89. Randall TC, Salicrup LA, Luciani S, Trimble EL. *HPV Testing in Resource-Limited Settings: How Can We Reach the Next Level of Cervical Cancer Screening in Latin America and the Caribbean?* **The oncologist**. 2015;20(10):1101-4.
90. Flores YN, Bishai DM, Lőrincz A, Shah KV, Lazcano-Ponce E, Hernández M, et al. *HPV testing for cervical cancer screening appears more cost-effective than Papanicolaou cytology in Mexico*. **Cancer Causes & Control**. 2011;22(2):261-72.
91. Wright T, Huang J, Baker E, Garfield S, Hertz D, Cox JT. *The budget impact of cervical cancer screening using HPV primary screening*. **The American journal of managed care**. 2015;22(3):e95-e105.

92. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. *Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer*. **Vaccine**. 2012;30:F88-F99.
93. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais*. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância, editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2012. 25 p.
94. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, et al. *Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials*. **The Lancet**. 2014;383(9916):524-32.
95. Abreu MNS, Soares AD, Ramos DAO, Soares FV, Nunes Filho G, Valadao AF, et al. *[Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga - State of Minas Gerais, Brazil]*. **Cien Saude Colet**. 2018;23(3):849-60.
96. Ribeiro CM, Dias MBK, Pla MAS, Correa FM, Russomano FB, Tomazelli JG. *[Parameters for programming line of care procedures for cervical cancer in Brazil]*. **Cad Saude Publica**. 2019;35(6):e00183118.
97. Freitas R, Carvasan G, Morais S, Zeferino L. *Excessive Pap smears due to opportunistic cervical cancer screening*. **European journal of gynaecological oncology**. 2007;29(5):479-82.
98. Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Moschaki V, Panteleris N, Agorastos T. *Comparison of cytology, HPV DNA testing and HPV 16/18 genotyping alone or combined targeting to the more balanced methodology for cervical cancer screening*. **Gynecologic oncology**. 2016.
99. Isidean SD, Mayrand M-H, Ramanakumar AV, Rodrigues I, Ferenczy A, Ratnam S, et al. *COMPARISON OF TRIAGE STRATEGIES FOR HPV POSITIVE WOMEN: CANADIAN CERVICAL CANCER SCREENING TRIAL RESULTS*. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**. 2017:cebp. 0705.2016.
100. Cox JT, Castle PE, Behrens CM, Sharma A, Wright Jr TC, Cuzick J. *Comparison of cervical cancer screening strategies incorporating different combinations of cytology, HPV testing, and genotyping for HPV 16/18: results from the ATHENA HPV study*. **American journal of obstetrics and gynecology**. 2013;208(3):184. e1-. e11.

101. De Strooper LM, van Zummeren M, Steenbergen RD, Bleeker MC, Hesselink AT, Wisman GBA, et al. *CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. Journal of clinical pathology.* 2014;67(12):1067-71.

102. Botezatu A, Goia-Rusanu CD, Iancu IV, Huica I, Plesa A, Socolov D, et al. *Quantitative analysis of the relationship between microRNA-124a,-34b and-203 gene methylation and cervical oncogenesis. J Molecular medicine reports.* 2011;4(1):121-8.

103. Wilting SM, van Boerdonk RA, Henken FE, Meijer CJ, Diosdado B, Meijer GA, et al. *Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. Mol Cancer.* 2010;9:167.

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto:

DETECÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL BASEADA EM COMBINAÇÕES DE CITOLOGIA CERVICAL, PESQUISA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO E PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES

INVESTIGADORES DO ESTUDO:

Hospital de Câncer de Barretos, Brasil:

Júlio César Possati Resende

José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

Adhemar Longatto Filho

Identificação do participante

Você está sendo convidada a participar deste estudo que será realizado pelo Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII. Este Termo de Consentimento explica porque este estudo está sendo realizado e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também descreve os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar. Após analisar as informações com a pessoa que explica este Termo de Consentimento, e esclarecer suas dúvidas, você deverá ter o conhecimento necessário para tomar uma decisão esclarecida sobre sua participação ou não neste estudo.

Você foi encaminhada ao Hospital de Câncer de Barretos para fazer um exame chamado colposcopia porque o seu exame de Papanicolaou veio com o resultado alterado. Neste exame o médico olhará o seu colo do útero com uma lente de aumento. Gostaríamos de aproveitar este momento do exame de colposcopia para convidá-la a participar deste estudo. As explicações deste estudo estão a seguir.

JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

O câncer do colo do útero é uma doença muito comum no Brasil e em diversos países no mundo. A principal estratégia de prevenção desta doença é o exame preventivo do colo do útero (exame de Papanicolaou). Mas este exame falha com frequência em diagnosticar o problema no colo do útero. Portanto, novas formas de prevenção do câncer do colo do útero precisam ser descobertas.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é avaliar novas formas de prevenção do câncer do colo do útero além do exame de Papanicolaou.

PROCEDIMENTOS

Se você aceitar participar do estudo e assinar este documento, antes de realizar o exame de colposcopia que foi agendado para você, o médico fará a coleta novamente do exame de Papanicolaou. Com uma escova especial, o médico raspará levemente o seu colo do útero e depois colocará esta escova dentro de um frasco com líquido conservante. Esta coleta será feita duas vezes, uma seguida da outra. Estes frascos serão encaminhados para o laboratório para análise. O tempo para a coleta dos dois exames de Papanicolaou é de aproximadamente um minuto. Após estas duas coletas, o médico fará o exame de colposcopia que estava agendado para você. O material do raspado do colo do útero encaminhado para o laboratório será analisado e, além do resultado do exame Papanicolaou, também será utilizado para as seguintes análises: 1) Detecção do Papilomavírus Humano (é um vírus que pode provocar o câncer do colo do útero e é

transmitido pelo sexo); 2) Detecção de células alteradas no colo do útero por meio de corantes (teste imunocitoquímico); 3) Detecção de uma proteína que pode provocar câncer. Se o seu exame de colposcopia apresentar alguma alteração, você será submetida a um procedimento chamado biópsia, que é a retirada de um pedaço bem pequeno do colo do útero para análise. Os resultados da colposcopia e das eventuais biópsias feitas durante o exame também poderão ser consultados e utilizados pelos pesquisadores deste estudo.

RISCOS E DESCONFORTOS PARA OS PARTICIPANTES

A coleta do exame de Papanicolaou já é normalmente realizada antes da colposcopia no Hospital de Câncer de Barretos. A diferença é que o Papanicolaou será colhido duas vezes ao invés de uma. Isto não trará maiores riscos para você e nem aumentará o tempo do exame de colposcopia de forma considerável. Mas durante a coleta do exame de Papanicolaou você poderá sentir uma leve pressão no fundo da vagina ou no pé da barriga, ou até mesmo uma cólica leve e passageira.

BENEFÍCIOS ESPERADOS

É possível que este estudo não traga benefícios diretos para você. Mas o conhecimento gerado por ele poderá beneficiar outras mulheres no futuro.

INTERRUPÇÃO DO ESTUDO

Este estudo poderá ser encerrado antes do prazo se houver dúvidas relativas à segurança das participantes ou por razões administrativas. Qualquer que seja o motivo, o estudo somente será interrompido depois da avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos que o aprovou, a não ser que existam razões de segurança que exijam a interrupção imediata do mesmo.

LIBERDADE DE RECUSA

A sua participação neste estudo é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do estudo e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente deste estudo e que elas não sejam usadas para mais nada. Você também poderá recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimento de alguma forma para você.

GARANTIA DE SIGILO

Os pesquisadores tomarão todas as medidas para manter suas informações pessoais em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados deste estudo forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação a seu respeito que possa identificar você publicamente. Contudo, durante o estudo, algumas pessoas do Hospital de Câncer de Barretos envolvidas diretamente na pesquisa poderão ter acesso aos seus dados. Mesmo assim, os seus dados serão preservados e não serão divulgados publicamente.

CUSTOS, REMUNERAÇÃO E INDENIZAÇÃO

A participação neste estudo não terá custos para você. Os custos relacionados diretamente com o estudo serão pagos pelo Hospital de Câncer de Barretos. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas envolvidas). A chance de você sofrer algum dano a sua saúde como resultado da sua participação nesse estudo é mínima, mas caso isto aconteça o Hospital de Câncer de Barretos será responsável por lhe dar o tratamento necessário e de forma gratuita. Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de obter indenização por dano a sua saúde se isto acontecer.

DESTINO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS

Todos os materiais biológicos coletados durante este estudo (dois exames de Papanicolaou e eventuais biópsias do colo do útero) e os dados obtidos durante o estudo não serão utilizados para outros fins além daqueles explicados neste Termo de Consentimento. Esses materiais não terão os seus dados pessoais, apenas códigos de identificação, para manter o seu sigilo. Depois de todas as análises terem sido realizadas, o material biológico que restar será adequadamente armazenado no Hospital de Câncer de Barretos. Se houver necessidade de fazer novas análises com seu material e/ou outras pesquisas, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB) avaliará esse novo uso. Sem a autorização deste comitê, novas pesquisas com o seu material não poderão ser realizadas. Apesar de este material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja destruído. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento neste hospital. Ao final deste termo você poderá decidir se autoriza o uso de seu material em pesquisas futuras (aprovadas pelo CEP-HCB) ou se prefere ser avisado em cada situação em que seu material seja utilizado em novos estudos para que você autorize ou não este uso.

ESCLARECIMENTOS ADICIONAIS, CRÍTICAS, SUGESTÕES E RECLAMAÇÕES

Você poderá tirar qualquer dúvida sobre o estudo, fazer críticas, sugestões e reclamações diretamente com o pesquisador principal deste estudo, Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani – telefone (17) 3321-6600, ramal 7009. Você também poderá entrar em contato com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB), localizado na Rua Antenor Duarte Vilela, 1331 – telefone (17) 3321-6600, ramal 6894, das 8:00h as 17:00h, de 2ª a 6ª feira, ou ainda pelo e-mail cep@hcancerbarretos.com.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

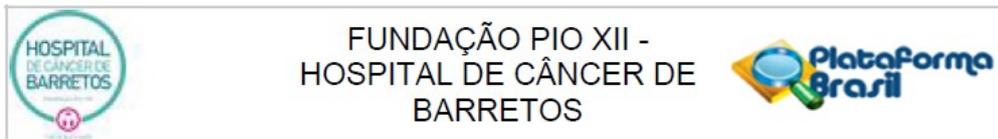
Entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém o leu para mim. Tive a oportunidade de pensar, fazer perguntas e falar a respeito do documento com outras pessoas quando precisei. Autorizo a minha inclusão neste estudo. Ao assinar este Termo de Consentimento, não renuncio a nenhum dos meus direitos legais. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará comigo e outra com o pesquisador.

Nome por extenso do participante de pesquisa ou do representante legal	Data	Assinatura
---	------	------------

Nome por extenso do responsável que explicou e obteve o Termo de Consentimento	Data	Assinatura
---	------	------------

Nome por extenso da testemunha imparcial (para casos de analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)	Data	Assinatura
---	------	------------

Anexo B – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO BASEADO NA COMBINAÇÃO DE CITOLOGIA CERVICAL, EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p16, KI67, MCM2, Top2a, E6 E DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.

Pesquisador: José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20656313.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 390.328

Data da Relatoria: 09/09/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta-se como referenciado no parecer 2, com mínimas modificações pelo pesquisador principal, que não altera a íntegra do projeto, esta emenda refere-se a inclusão de um novo pesquisador na equipe do projeto, o Prof. Dr. Eduardo L. Franco da Universidade McGill (Montreal, Canadá) que auxiliará

O projeto apresenta-se como referenciado no parecer 2, com mínimas modificações pelo pesquisador principal, que não altera a íntegra do projeto, esta emenda refere-se a inclusão de um novo pesquisador na equipe do projeto, o Prof. Dr. Eduardo L. Franco da Universidade McGill (Montreal, Canadá) que auxiliará intelectualmente o projeto, além disso é uma das referências mundiais no campo do estudo, o que será de grande valia para o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

São os mesmos já apresentados. Pequenas modificações que foram apresentadas no projeto não modificou os objetivos iniciais apresentados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos apresentados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os mesmos apresentados anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos se apresentam corretos.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-6600 Fax: (17)3321-6629 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 390.328

Recomendações:

Não tenho mais nenhuma recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda está aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU a EMENDA ao referido projeto e decidindo que a mesma encontra-se APROVADA.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para 22/02/2014.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o Biobanco para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 733/2013.

BARRETOS, 10 de Setembro de 2013

Assinador por:
Sergio Vicente Serrano
 (Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-6600 Fax: (17)3321-6629 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

