Noely Paula Cristina Lorenzi

**Autocoleta cervicovaginal no rastreamento do câncer
do colo do útero: aceitabilidade, detecção de
Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico e
pesquisa de biomarcadores**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Soares
Júnior

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lorenzi, Noely Paula Cristina

Autocoleta cervicovaginal no rastreamento do
câncer do colo do útero : aceitabilidade, detecção de
Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico e
pesquisa de biomarcadores / Noely Paula Cristina
Lorenzi. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: José Maria Soares Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias uterinas 2.Colo do
útero 3.Papilomavírus humano 4.Autocoleta
5.Aceitabilidade 6.Inibidor p16 de quinase
dependente de ciclina 7.Antígeno Ki-67 8.Alfa-
manosidase 9.Superóxido dismutase

USP/FM/DBD-298/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: *Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedico este estudo

à mamãe Nancy

e ao papai Manuel,

que vivem no plano espiritual.

E aos amores de minha vida,

Diego e Felipe

Sou feita de retalhos.

Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma.

Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas que me acrescentam e me fazem ser quem eu sou.

Em cada encontro em cada contato vou ficando maior...

Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade...

Que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa.

E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também.

E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados...

Haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma.

Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim.

Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias.

E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de “nós”.

Cris Pizzimenti

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo, em especial:

Ao Professor Doutor José Maria Soares Júnior pela orientação nesta jornada, pelo incentivo, pela dedicação.

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat, que propiciou a realização deste estudo, estimulando o aprimoramento científico.

À Doutora Maricy Tacla, coordenadora do Ambulatório de PTGI, pelo acolhimento, pelo aprendizado e auxílio no desenvolvimento deste estudo.

À Doutora Lana Maria de Aguiar, querida orientadora de minha dissertação de mestrado, pelo incentivo inicial e constante. Por sempre me “empurrar para a frente”.

Ao Doutor Walter Pinheiro, chefe do Ambulatório de Ginecologia, pela amizade, estímulo e confiança.

À Professora Luiza Lina Villa, admirável pesquisadora, que abriu as portas do seu laboratório para a realização deste estudo. Através do seu rigor, com doçura, estimulou-me a procurar “a cereja do bolo”, culminando com a realização desta pesquisa. Grazie tanto, Professora!

Ao Professor and Chairmain Eduardo Franco, do Departamento de Oncologia e Epidemiologia e Bioestatística da McGill University, que despertou em mim o desejo

adormecido pela pesquisa através da sua competência, didática e entusiasmo. Muito grata pelo incentivo!

À Doutora Lara Termini, pelo auxílio no começo, meio e fim deste estudo. Pela infindável colaboração e paciência. Pelo bom humor, amizade e companheirismo. Por me ajudar a encontrar as cerejas... também, em San Pietro in Bevagna. Grazie tanto!

À Professora Ana Paula Lepique, mente inquieta e ativa, por todas as oportunidades de pesquisa, pelo estímulo, pela compassividade, pelo aprendizado. Pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Professor Adhemar Longatto Filho, incrível pesquisador e citologista, pela enorme contribuição neste estudo. Pelo gentil acolhimento, desdobramento e competência. Grazie Mille!

Ao Doutor Roberto El Ibrahim e Doutor Filadelfio Euclides Venco, do Laboratório Diagnóstika, pela enorme receptividade, pela delicadeza e confiança que depositaram em mim. Pela contribuição fundamental para que este estudo pudesse ser realizado.

Ao Doutor Daniel Chang, citopatologista, pela presteza e colaboração na leitura da citologia em base líquida. Às atenciosas recepcionistas e citotécnicas pelo preparo das lâminas.

Às queridas pós-graduandas do Laboratório de Inovação em Câncer, Rafaella Almeida Lima Nunes e Gabriela Avila, Rafa e Gabi, com quem muito aprendi. Pela delicadeza e dedicação e “mãos na massa”, sem as quais, a concretização deste estudo não seria possível.

Aos novos amigos do Laboratório, Ricardo, Giana, Mirian, pela alegre acolhida.

Ao caro Alex Jones Flores Cassenote, que com paciência e competência transformou nossos números em resultados... inestimável significância.

À Doutora Rossana Verônica Mendonza Lopez pelo grande auxílio na elaboração da estatística.

À Sra. Maria Luiza Flynn, dear brilliant English teacher, pela participação neste estudo. Thank you very much.

À Raquel Hessel, que me socorreu a tempo em meio a tantos papéis e notas fiscais e que, com presteza, ajudou-me na organização de todos.

À Cláudia Vieira, por toda a montagem e editoração deste estudo. Pela grande responsabilidade, ajuda constante e demonstração de amizade.

À Silvia Mancini, pelo incentivo e auxílio nos passos iniciais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Obstetrícia e Ginecologia, especialmente à Sra. Lucinda, pela orientação.

Aos colegas do Hospital Universitário e Hospital das Clínicas, em especial às Doutoradas Kaori, Mariana Beldi, Márcia Kamilos, Eliana, Haydée, Ana Marta, Fabi, Renata Robial, Cris Castanheira e Cristiane Roa pela colaboração e estímulo.

Ao Edson Ferreira Filho, menino inteligente, com grande futuro, pela especial colaboração.

Ao Fernando, meu esposo, companheiro desta jornada, pela paciência e auxílio nos dias difíceis.

À minha querida família.

Às pacientes, que sublimando o sofrimento, possibilitaram este estudo, através da participação.

Mais uma vez, a todos aqueles que direta, ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo, o meu muito obrigada.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio à pesquisa número 2016/16847-0.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
1.1	Breve histórico do Papilomavírus Humano	1
1.2	Epidemiologia do câncer cervical uterino	2
1.3	Biologia do HPV: genoma, taxonomia e filogenia.....	3
1.4	Proteínas virais.....	8
1.5	Imunologia cervicovaginal e mecanismos de evasão viral do HPV	11
1.6	Patogenia e ciclo de vida viral	15
1.7	Principais fatores coadjuvantes à oncogenicidade do HPV	18
1.7.1	Imunossupressão	18
1.7.2	Microbioma e Infecções associadas	19
1.7.3	Tabagismo	20
1.7.4	Anticoncepcional Hormonal	20
1.7.5	Paridade.....	21
1.8	Teste de Papanicolaou.....	21
1.9	Citologia em base líquida	23
1.10	Teste de DNA-HPV	24
1.11	Biomarcadores	28
1.11.1	Proteínas p16/Ki-67	29
1.11.2	Superóxido dismutase de manganês	32
1.11.3	Alfa-manosidade	34
1.12	Autocoleta	36
2	Objetivos.....	38
2.1	Objetivos específicos	38

3 Métodos.....	39
3.1 Casuística	39
3.2 Critérios de inclusão.....	40
3.3 Critérios de exclusão.....	41
3.4 Grupos	41
3.5 Citologia em base líquida	46
3.6 Exame colposcópico	47
3.7 Procedimento Histológico.....	48
3.8 Detecção e genotipagem de HPV	49
3.9 Imunocitoquímica para detecção de p16 ^{INK4a} /Ki-67.....	50
3.10 Imunocitoquímica para a detecção de α -manosidase e SOD2	54
3.11 Acompanhamento das participantes	56
3.12 Análise estatística	57
4 Resultados.....	60
4.1 Aceitabilidade da autocoleta cervicovaginal	60
4.2 Associação entre análises citológicas, presença de HrHPV, achados colposcópicos, achados anatomopatológicos e biomarcadores.....	67
4.3 Flora vaginal, presença de HrHPV e achados anatomopatológicos.....	84
5 Discussão	88
5.1 A autocoleta e a detecção de HrHPV	93
5.2 Desempenho citológico	100
5.3 Dupla-coloração por p16/Ki-67	102
5.4 Superóxido dismutase de manganês - SOD2	104
5.5 O microambiente tumoral	106
5.6 Expressão da α -manosidase.....	107
5.7 Painel de biomarcadores.....	108
5.8 Considerações finais	109
6 Conclusões.....	112
7 Anexos.....	113
8 Referências	123
Apêndice	

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

®	Marca registrada
µl	Microlitro
AC	Autocoleta
AD	Anno Domini
Adenoca	Adenocarcinoma
AGC	<i>Atypical glandular cells</i> - Células glandulares atípicas, possivelmente não neoplásicos
AGCFN	<i>Atypical glandular cells, favor neoplasia</i> - Células glandulares atípicas, não se podendo afastar lesão de alto grau
AGM	alto grau para malignidade citológica
AHCO	Anticoncepcional hormonal combinado oral
AIS	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
AP	Anatomopatológico
ASCH	<i>Atypical squamous cells, that we can not exclude high-grade squamous lesion</i> - Células escamosas atípicas, não se podendo afastar lesão de alto grau
ASCUS	<i>Atypical squamous cells of undetermined significance</i> - Células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas
AUC	<i>Area under curve</i> – área sob a curva
BD	<i>Becton Dickinson</i>
BGM	Baixo grau para malignidade citológica
CC	Carcinoma cervical uterino
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> – Grupamento de diferenciação
CEC	Carcinoma escamoso cervical
Colabs	Colaboradores
CST	<i>Community State Type</i> – Tipo de comunidade no microbioma
CTO	Centro de Investigação Translacional em Oncologia
DAB	Diaminobenzidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
E	Early – precoce
E6AP	<i>Ubiquitin E6 Associated protein</i> – ubiquitina ligase proteína associada a E6
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	<i>Growing</i> – crescimento

HC	Hospital das Clínicas
HCGs	<i>Hyperchromatic Crowded Cells</i> – Células hiper Cromáticas agrupadas
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> – Papilomavírus Humano
HrHPV	<i>High-Risk Human Papillomavirus</i> – Papilomavírus de alto risco oncogênico
HSIL	<i>High squamous intraepithelial lesion</i> - Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
HSILNEMI	<i>High squamous intraepithelial lesion, non excluding microinvasion</i> - Lesão intraepitelial de alto grau, não se podendo afastar microinvasão
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN	Interferon
IIQ	Intervalo interquartil
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRF	<i>Interferon regulatory fator</i> – Fator regulador de Interferon
JEC	Junção escamocolumnar
KW	Kruskal Wallis
L	<i>Late</i> – tardia
L.	<i>Lactobacillus</i>
LBC	<i>Liquid Based Cytology</i> – Citologia em base líquida
LCR	Long Control Region – Região Controladora Longa
LRN	<i>Likelihood ratio negative</i>
LRP	<i>Likelihood ratio positive</i>
LSIL	Low squamous intraepithelial lesion - Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
Ltda	Limitada
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> – Complexo Principal de Histocompatibilidade
Mø	Macrófago
MW	Mann Whitney
NFkB	Nuclear Factor kB – Fator nuclear kB
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NILM	negativo para lesão intraepitelial ou malignidade citológica
NK	<i>Natural Killer</i>
NLP	negativo para lesão precursora no anatomopatológico
nm	nanômetro
ORF	<i>Open reading frames</i>
Pap	Teste de Papanicolaou
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação da polimerase em cadeia
pRB	Proteína supressora do tumor do retinoblastoma

PS	Profissional da Saúde
PTGI	Patologia do Trato Genital Inferior
Redox	Redução/oxidação
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> – Espécies reativas de Nitrogênio
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Espécies reativas de Oxigênio
S	Synthesis – síntese
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único da Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> – Fator de crescimento transformador
TLR	<i>Toll-like receptors</i> – Receptores toll-like
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> – Fator de necrose tumoral
™	<i>Trade marketing</i>
USA	Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
VB	Vaginose bacteriana
VLP	<i>Virus Like Particles</i> – partículas semelhantes a vírus
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
ZT	Zona de Transformação
ZTA	Zona de transformação anormal
α	alfa
β	Beta

Lista de Figuras

Figura 1	Micrografia eletrônica de partículas de Papilomavírus.....	4
Figura 2	Representação esquemática do genoma do HPV e as principais funções dos genes virais. HPV e suas regiões funcionais: <i>Long Control Region</i> (LCR) e as <i>Open Reading Frames</i> (ORF) que codificam as diferentes proteínas virais E – precoces e L – tardias.....	5
Figura 3	Classificação dos Papilomavírus humanos. Os HPVs agrupam-se taxonomicamente na família <i>Papillomaviridae</i> . São divididos em cinco gêneros: Alfa, Beta, Gamma, Mu e Nupapilomavírus. Os tipos incluídos nos gêneros dos Alfapapilomavírus são classificados em cutâneos de baixo risco oncogênico e mucosos de baixo e alto risco oncogênico.....	7
Figura 4	Ciclo de replicação do HPV. Através de microlesões, o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio estratificado. À medida que as células basais se diferenciam, os genes precoces E1 e E2 são expressos. Nas camadas mais diferenciadas, as proteínas do capsídeo são expressas e os vírions formados, liberados na superfície da mucosa, onde podem infectar outras células.....	17
Figura 5	<i>Rovers®</i> ; <i>EvalynBrush®</i>	42
Figura 6	Fluxograma com resumo do método.....	45
Figura 7	Representação esquemática da reação imunocitoquímica para p16 ^{INK4a} /Ki-67.....	51
Figura 8	Dupla marcação (p16/Ki-67), núcleo e citoplasma, em participante com HSIL.....	53
Figura 9	Dupla marcação (p16/Ki-67), núcleo e citoplasma, em participante com carcinoma invasivo.....	53

Figura 10	Coloração positiva para α -manosidase, marrom acastanhada em citoplasma, em aglomerado celular, em participante com HSIL.....	55
Figura 11	Coloração positiva representativa para SOD2, marrom acastanhada em citoplasma, em participante com HSIL. Detalhe: aspecto focal, de outra área, com células fortemente coradas para SOD2, na mesma lâmina.....	56
Figura 12	Distribuição do SOD2 escore de acordo com as categorias do anatomopatológico, estratificado de acordo com os grupos.....	74
Figura 13	Distribuição da α -manosidase escore de acordo com as categorias do anatomopatológico, estratificado de acordo com os grupos.....	75
Figura 14	Curva ROC para os escores de manosidade, SOD2 e final geral e estratificada de acordo com grupo de profissionais da saúde e autocoleta.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise descritiva estratificada por idade, incluindo frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	61
Tabela 2	Análise estratificada da percepção da mulher sobre a escova, segundo estratos etários, incluindo frequência absoluta, frequência relativa e nível descritivo (p-valor).	63
Tabela 3	Motivos que levariam a mulher a optar pela autocoleta ou pela coleta com profissionais de saúde, incluindo frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	64
Tabela 4	Distribuição da variável idade, segundo as categorias de cada variável que avaliou a percepção da mulher em relação ao uso da escova, incluindo as medidas de tendência central, de posição e de dispersão.....	65
Tabela 5	Análise descritiva das características qualitativas estratificada de acordo com os grupos de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95% e nível descritivo.....	68
Tabela 6	Análise descritiva das características quantitativas estratificada de acordo com os grupos de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo média, desvio padrão, mediana, intervalo interquartil (P25-P75) e nível descritivo.....	70
Tabela 7	Associação entre análises citológicas, presença de HrHPV, achados colposcópicos e achados anatomopatológicos, estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo, estratificada de acordo com os grupos de profissionais da saúde e autocoleta.....	72
Tabela 8	Parâmetros diagnósticos do HrHPV geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de	

	saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	73
Tabela 9	Associação entre p16/Ki-67 estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo.....	76
Tabela 10	Associação entre lâminas inadequadas (<i>out</i>) para leitura estratificada de acordo com grupo de profissionais da saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo.....	77
Tabela 11	Área sob a curva ROC para os escores de manosidase, SOD2 e final geral e estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo nível descritivo e intervalo de confiança de 95%.....	79
Tabela 12	Coordenadas da curva ROC para os escores de manosidase, SOD2 e final geral e estratificadas de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo sensibilidade e especificidade.....	80
Tabela 13	Parâmetros diagnósticos dos biomarcadores manosidase, SOD2, p16/Ki-67 e final geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	82
Tabela 14	Parâmetros diagnósticos da citologia em base líquida geral e estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	83
Tabela 15	Parâmetros diagnósticos da citologia em base líquida geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%).....	84
Tabela 16	Distribuição da flora vaginal, segundo resultado anatomopatológico, descrita na citologia em base líquida.....	85
Tabela 17	Flora vaginal encontrada na citologia em base líquida e presença de HrHPV nas participantes do estudo.....	86
Tabela 18	Distribuição da <i>Gardnerella vaginalis</i> , grau de lesão e HrHPV nas participantes dos grupos autocoleta <i>versus</i> profissional de saúde.....	87

Lista de Gráficos

- Gráfico 1 Representação gráfica das respostas do questionário de aceitabilidade entre as mulheres, conforme a idade. A- distribuição de idade, segundo o item de entendimento do uso da escova de autocoleta; B - distribuição de idade, segundo o item uso da escova de autocoleta; C - distribuição de idade, segundo o item desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta; D - distribuição de idade, segundo o item embaraçada ou envergonhada no uso da escova da autocoleta; E - distribuição de idade, segundo o item medo de se machucar no uso da escova de autocoleta; F - Distribuição de idade, segundo o item autocoleta *versus* coleta por profissional da saúde..... 66

Resumo

Lorenzi NPC. *Autocoleta cervicovaginal no rastreamento do câncer do colo do útero: aceitabilidade, detecção de Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico e pesquisa de biomarcadores* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2019.

Introdução: o câncer cervical uterino (cc) é, ainda, sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento, sendo uma das principais causas de morte em mulheres adultas no Brasil. Apesar da inquestionável contribuição do exame citológico de Papanicolaou na redução do cc, este tem grande variação na sua sensibilidade e especificidade na detecção de lesões neoplásicas cervicais, além de muitas mulheres não terem acesso ao sistema de saúde para a realização deste exame, principalmente em regiões menos desenvolvidas em nosso país. O estabelecimento do HPV como agente etiológico do cc permitiu novas formas de rastreamento, cujo alvo é o material genético do HPV, especificamente os de alto risco oncogênico (HrHPV). Muitos estudos demonstraram bom custo-efetividade dos testes para detecção do DNA do HrHPV com a vantagem de poderem ser realizados com material colhido pela própria mulher, denominando-se autocoleta. O teste identifica o vírus, mas não a lesão precursora ou mesmo o câncer, podendo levar a aumento de exames desnecessários, devido à alta prevalência e transitoriedade da infecção pelo HPV. A utilização de biomarcadores pode constituir valioso auxílio na acurácia dos testes de rastreamento. As proteínas E6 e E7 dos HrHPV promovem a degradação das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente, podendo resultar na exacerbação da proteína inibitória p16^{ink4a} e proteína Ki-67, cuja detecção simultânea sugere um sinal de desregulação celular, ou mesmo, progressão da lesão induzida pelo HPV; uma das principais enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase de manganês (SOD2), também, apresenta expressão aumentada em vários tumores associados ao HPV; outra enzima, a alfa(α)-manosidase pode ter seu papel na progressão de tumores associados ao HPV por possível ação na modulação de respostas inflamatórias nos tumores. Assim, a combinação de todos poderia auxiliar na identificação de mulheres sob risco do cc em regiões remotas do nosso país. **Objetivos:** o estudo visa avaliar: 1) a aceitabilidade da autocoleta; 2) o resultado da citologia em meio líquido (LBC) do grupo autocoleta (AC) *versus* grupo profissional de saúde (PS), com relação ao diagnóstico anatomopatológico (AP); 3) o resultado da pesquisa de HrHPV realizado pelo grupo AC *versus* grupo PS; 4) o resultado da pesquisa do biomarcador p16/Ki-67 colhido pelo grupo AC *versus* grupo PS com relação ao diagnóstico AP; 5) os resultados da pesquisa dos biomarcadores α-manosidase e SOD2 colhidos pelo grupo AC *versus* grupo PS com relação ao diagnóstico AP. **Métodos:** estudo prospectivo e transversal envolveu 232 participantes divididas em dois grupos, PS e AC, com alteração citológica e indicação de colposcopia. Foram atendidas nos ambulatórios de Ginecologia, da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital Universitário e Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Registrou-se história clínica e coleta de dados sociodemográficos. Coletou-se material para a

execução de LBC, detecção de HrHPV (COBAS 4800®) e pesquisa de biomarcadores por imunocitoquímica: p16/Ki-67 (*CINtec PLUS®cytology*), α -manosidase e SOD2 pelos grupos AC e PS. O padrão-ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade foi o resultado AP. O procedimento de autocoleta foi realizado, utilizando-se a escova *EvalynBrush®(Rovers®)*, após orientação verbal e de folheto ilustrativo. Estas participantes foram divididas em três faixas etárias (≤ 29 , 30-49, ≥ 50) e convidadas, após o procedimento, a responder questionário de aceitabilidade da autocoleta. **Resultados:** A maior parte, 76,7%, das mulheres declararam sua preferência pela AC, 12,9% preferiram coleta pelo PS e 10,3% referiram indiferença ao método na avaliação da aceitabilidade do AC. Os principais motivos pela AC foram: praticidade (todas as faixas etárias), menos constrangimento (≤ 29 e ≥ 50 anos), poder colher em casa/laboratório/UBS (30-49 anos). A maioria não se sentiu embaraçada, e houve efeito de menor medo e desconforto, na coleta, conforme a idade aumentava. A detecção de HrHPV em NIC 2+ no grupo AC foi 94,1% (HPV16: 37,7%, HPV-outros tipos: 36%, coinfeção: 18%) e no grupo PS foi 93,7% (HPV-outros tipos: 43,9%, HPV16: 34,7%, coinfeção: 12,2%). Os resultados da análise da LBC foram: citologia AGM associada a NIC 2+, grupos PS, 83,8% x AC, 82,3%. Citologia BGM associada a NIC 2+ teve os seguintes valores para PS e AC: 50,0% e 67,9% respectivamente; citologia NILM associada a NIC 2+ mostrou os seguintes valores para PS e AC: 33,3% e 62,5%, respectivamente. Análise dos biomarcadores mostrou sensibilidade de p16/Ki-67 nos grupos PS e AC de 84,4% e 70,6%, respectivamente. A α -manosidase apresentou sensibilidade para os grupos PS e AC de 50,0% e 42,1%, e SOD2, 56,4% e 33,7%, respectivamente. As especificidades das reações p16/Ki-67, α -manosidase e SOD2 no grupo PS foram, respectivamente, 59,2%, 69,2% e 67,7%. No grupo AC, os valores para os mesmos testes foram: 85,7%, 85,7% e 75,0%, respectivamente. A acurácia, no escore final, do p16/Ki-67 foi de 80,7% no grupo PS e de 74,7% no grupo AC. **Conclusões:** Autocoleta cervicovaginal teve boa aceitabilidade nas mulheres referenciadas para exame colposcópico em hospitais universitários de atendimento secundário e terciário à saúde. A LBC teve forte associação nas categorias “alto grau de malignidade” citológica e NIC 2+ para ambos os grupos, PS e AC. Associação fraca foi observada entre as categorias “negativo para lesão intraepitelial ou malignidade” citológica e NIC 2+, com menor desempenho no grupo AC em comparação com o grupo PS. A detecção de HrHPV em amostras AC e amostras coletadas pelo PS apresentaram semelhante sensibilidade e especificidade para detecção de NIC 2+, mostrando a não inferioridade do desempenho clínico para detecção de HrHPV da AC *versus* coleta pelo PS. O biomarcador p16/Ki-67 apresentou bom desempenho, com maiores índices de positividade em NIC 2+ e maiores índices de negatividade em NLP e NIC 1, em ambos os grupos, com associação mais nítida no grupo PS. Os biomarcadores SOD2 e α -manosidase tiveram expressão crescente, conforme gravidade de lesão cervical. A expressão foi maior no grupo PS em comparação ao grupo AC com relação ao SOD2, contrariamente a α -manosidase, que foi maior no grupo AC. A combinação dos biomarcadores apresentou boa acurácia na predição de NIC 2+ em ambos os grupos sem diferença estatística entre eles. Portanto, a autocoleta apresentou boa aceitabilidade e, associada a biomarcadores, boa acurácia para detecção de mulheres sob risco do câncer do colo do útero.

Descritores: Neoplasias uterinas; Colo do útero; Papilomavírus humano; Autocoleta; Aceitabilidade; Inibidor p16 de quinase dependente de ciclina; Antígeno Ki-67; Alfa-manosidase; Superóxido dismutase.

Summary

Lorenzi NPC. *Cervicovaginal self-collection in cervical cancer screening: acceptability, detection of high-risk Human Papillomavirus, and research into biomarkers* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Cervical cancer (CC) is still a serious public health issue in developing countries, and it is one of the main causes of death of adult women in Brazil. Notwithstanding the unquestionable contribution of conventional cytology, i.e., the Papanicolaou test, in reducing CC, the test varies widely in sensitivity and specificity in the detection of cervical neoplastic lesions. Besides, many women do not have access to the public health system for taking the Pap smear, primarily in the less developed parts of the country. The consensus that HPV is the etiological agent of CC has enabled the development of new screening methods aimed at HPV genetic material, especially the high-risk for cancer HPVs (HrHPVs). A number of studies have demonstrated the good cost-effectiveness of the DNA detection tests for HrHPV; these have the additional advantage of being optionally performed with material collected by the woman herself, and this procedure is known as self-collection. However, the test identifies the virus but not the precursor lesion or even cancer, with the consequent need for additional exams, albeit unnecessary, given the high prevalence and the transience of HPV infection. Biomarkers may be used as a valuable aid in improving the accuracy of screenings tests. The E6 and E7 proteins of HrHPV promote the degradation of the p53 and pRb tumor suppressing proteins, respectively, possibly leading to the exacerbation of inhibitor protein p16^{ink4a} and of protein Ki-67, with the simultaneous detection of both suggesting a deregulation of cell signaling or even progression of the HPV-induced lesion. Furthermore, one of the main antioxidant enzymes, manganese superoxide dismutase (SOD2), also has increased expression in several HPV-associated tumors; another enzyme, alpha (α)-mannosidase, may play a role in the progression of HPV-associated tumors, perhaps due to modulation of tumor inflammatory responses. Thus, all of the aforementioned factors, when combined, could aid in the identification of women at risk of CC in the remote regions of our country. **Objectives:** This study had the purpose of evaluating the following: 1) self-collection acceptability; 2) the results of the liquid-based cytology (LBC) of the self-collection (SC) group versus those of the health professional (HP) group and the results of both groups contrasted with the anatomopathologic (AP) diagnoses; 3) the results of HrHPV testing undergone by the SC group versus those of the HP group; 4) the results of biomarker p16/Ki-67 testing undergone by the SC group versus those of the HP group by contrast with the AP diagnoses; 5) the results of the testing with α -mannosidase and SOD2 biomarkers undergone by the SC group versus those of the HP group compared with the AP diagnoses. **Methods:** This is a prospective cross-sectional study involving 232 participants with cytological abnormalities and a referral to colposcopy, who were allocated to two groups, SC and HP. They were assisted at the Gynecology Outpatient Clinics, Gynecology Discipline, Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital and Clinics Hospital, School of Medicine, University of São Paulo. Medical histories were taken down and sociodemographic data were

compiled. Material from the women in both the SC and the HP groups was collected for carrying out LBC, HrHPV detection (COBAS 4800®), and immunocytochemical testing of the following biomarkers: p16/Ki-67 (CINtec PLUS® cytology), α -mannosidase, and SOD2. The gold standard for the assessment of sensitivity and specificity was the AP result. Self-collection was performed with the EvalynBrush® (Rovers®) brush following verbal instructions and those from a leaflet with illustrations. The participants were divided into three age brackets (≤ 29 , 30-49, ≥ 50) and, after the SC procedure, they were invited to answer a questionnaire about the acceptability of SC. **Results:** Most women (76.7%) declared their preference for SC, relatively few (12.9%) preferred collection by a HP, and about the same proportion (10.3%) reported indifference to the collection method. The major reasons underlying the option for SC were the following: practicality (all age brackets), less embarrassment (≤ 29 and ≥ 50 years), and the possibility of collection at home/laboratory/basic health unit (30-49 years). Most participants did not feel embarrassed, and, as age advanced, the effect of fear or discomfort during collection diminished. Detection of HrHPV in CIN 2+ in the SC group was 94.1% (HPV16, 37.7%; HPV-other types, 36%; coinfection, 18%) and in the HP group, 93.7% (HPV-other types, 43.9%; HPV16, 34.7%; coinfection, 12.2%). The results of LBC were as follows: high-grade malignancy (HGM) cytology associated with CIN 2+, was, in the HP group, 83.8%, and in the SC group, 82.3%; low-grade malignancy (LGM) cytology associated with CIN 2+, was, in the SC group, 67.9%, and in the HP group, 50.0%; negative for intraepithelial lesion/ malignancy (NILM) associated with CIN2+, was, in the SC group, 62.5%, and in the HP group, 33.3%. As for the biomarkers, p16/Ki-67 showed sensitivity of 84.4% and 70.6% in the HP and in the SC groups, respectively; α -mannosidase had a sensitivity of 50.0% and 42.1% in groups HP and SC, respectively; and the sensitivity of SOD2 in the HP group was 56.4% and in the SC group was 33.7%. The specificities of the p16/Ki-67, α -mannosidase, and SOD2 reactions in the HP group were 59.2%, 69.2% e 67.7%, respectively, and in the SC group, 85.7%, 85.7% e 75.0%, respectively. In the final score, accuracy of p16/Ki-67 was 80.7% in the HP group and 74.7% in the SC group. **Conclusions:** Cervicovaginal self-collection was well-accepted by the women referred to a colposcopy examination at university hospitals specialized in secondary and tertiary health assistance. The LBC was strongly associated with cytological high-grade malignancy and with CIN 2+ in both the HP and the SC groups. Weak association was observed between cytological NILM and CIN 2+, and the connection was weaker in the SC group than in the HP group. Results of HrHPV detection in patients with CIN 2+ from both the SC and the HP groups were similar in terms of sensitivity and specificity, indicating that self-collection is not inferior to collection by health professionals to HrHPV detection. The performance of the p16/Ki-67 biomarker was good, with higher indices of positivity in CIN 2+ and of negativity in NPL and CIN 1 in both groups, albeit with a clearer association in the HP group. Expression of the SOD2 and the α -mannosidase biomarkers increased in parallel with the severity of the cervical lesion; however, SOD2 expression was higher in the HP group than in the SC group, whereas α -mannosidase was higher in the SC group. The accuracy of the combination of biomarkers in predicting the presence of CIN 2+ was reasonable in both groups with no statistical difference between them. In short, self-collection proved to be acceptable and, when associated with biomarkers, proved to be accurate in the detection of women at risk of cervical cancer.

Descriptors: Uterine neoplasms; Cervix Uteri; Human Papillomavirus; Self-collection; Acceptability; Cyclin-dependent kinase inhibitor p16; Ki-67 antigen; Alpha-mannosidase; Superoxide dismutase.

1 Introdução

1.1 Breve histórico do Papilomavírus Humano

As primeiras descrições de lesões genitais verrucosas foram relatadas por Celsus no ano 25 A.D., que foi citado por Oriel¹. Entretanto, as lesões sifilíticas dominavam o pensamento médico da época, sendo indiferenciadas das lesões condilomatosas não sifilíticas. Em 1793, Bell reconheceu a diferença entre as lesões por sífilis e lesões condilomatosas, mas, por vezes, estas últimas eram referidas como lesões gonorreicas¹.

A primeira evidência da etiologia viral das lesões verrucosas foi reportada no século XX. Em meados de 1970, coilocitose, o padrão histológico patognomônico de infecção por Papilomavírus Humano (HPV), foi descrito nas displasias leves do colo uterino, correspondendo, na atual nomenclatura, às neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) grau 1. Associava-se, desta forma, infecção por HPV com neoplasia cervical uterina².

Após inúmeras pesquisas, estudos laboratoriais do grupo de pesquisadores coordenados por Harald zur Hausen, do Centro Alemão de Pesquisas sobre o Câncer, mostraram que a maior parte das verrugas genitais continham sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) de dois tipos de HPV, os HPVs 6 e 11³. Logo após, caracterizaram novos e diferentes tipos de DNA, dos HPVs 16 e 18, em biópsias oriundas de carcinomas da cérvix uterina³. A contribuição do grupo de zur Hausen na elucidação

da causa infecciosa no câncer cervical uterino foi fundamental, conferindo-lhe, por consequência, em 2008, o prêmio Nobel de Medicina juntamente a dois outros virologistas, Françoise Barré Sinoussi e Luc Montagnier pelo isolamento do vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida³.

1.2 Epidemiologia do câncer cervical uterino

Nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, a incidência do câncer cervical uterino e as taxas de mortalidade vem declinando há décadas devido ao rastreamento crescente⁴. Ainda assim, em alguns países desenvolvidos, uma em cada 125 mulheres (até 64 anos), ainda, tem um risco cumulativo na vida de desenvolver a doença⁵. As regiões do mundo que apresentam as mais elevadas taxas de incidência/mortalidade por câncer cervical uterino são as regiões Sul, Ocidental e Oriental do continente Africano, além das porções Sul e Central do continente Asiático e Sul Americano⁶. Houve cerca de 570 mil casos novos por ano no mundo, sendo o câncer do colo uterino responsável pelo óbito de 311 mil mulheres em 2018⁶.

No Brasil, excetuando-se os cânceres de pele (não melanoma), esta neoplasia é a mais incidente na região Norte, a segunda mais incidente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e, ocupa ainda, a terceira e quarta posições nas regiões Sudeste e Sul do país, respectivamente⁷.

O Ministério da Saúde, pelo seu órgão coordenador das ações nacionais de prevenção e controle do câncer, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) em conjunto com as Secretarias de Saúde desenvolveram o Programa Nacional de Controle do Câncer

do Colo do Útero, que pode ser acessado através do seu manual de diretrizes brasileiras⁸.

No Brasil, em 2016, foram registrados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero e, ainda assim, estimam-se 16.370 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019, com risco estimado de cerca de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres⁷.

A heterogeneidade das condições sociais, econômicas e culturais de diferentes populações, com diferenças importantes ao acesso a bons programas de rastreamento e tratamento adequado às mulheres com resultados alterados, apresenta-se pelas díspares estatísticas de incidência e mortalidade descritas. Isto poderia justificar a grande incidência de câncer de colo uterino nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

1.3 Biologia do HPV: genoma, taxonomia e filogenia

Os HPVs são vírus de DNA não envelopados pertencentes à família *Papillomaviridae*, que compreende um grupo heterogêneo de vírus espécie-específicos, que apresentam tropismo por células epiteliais escamosas e glandulares.

Suas partículas virais têm diâmetro de aproximadamente 55nm, apresentando-se sob a forma icosaédrica de simetria pentagonal, constituídas por 72 unidades, denominadas capsômeros⁹ (Figura 1).

Figura 1 – Micrografia eletrônica de partículas de Papilomavírus¹⁰

O genoma viral é constituído por dupla hélice circular de DNA, com aproximadamente 8.000 pares de bases. O genoma dupla-fita pode ser dividido em três regiões funcionalmente diferentes: região controladora longa ou LCR (*Long Control Region*), região precoce ou E (*Early*) e região tardia ou L (*Late*) (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV e as principais funções dos genes virais. HPV e suas regiões funcionais: *Long Control Region* (LCR) e as *Open Reading Frames* (ORF) que codificam as diferentes proteínas virais E – precoces e L – tardias

FONTE: Adaptado de Villa, 1997¹¹

A LCR localiza-se entre os genes L1 e E6 e compreende aproximadamente 10% do genoma viral. Nesta região ligam-se os fatores de transcrição celulares e virais que regulam a transcrição e a replicação do HPV¹².

As regiões precoce e tardia estão divididas em genes. Os genes da região L (L1 e L2) codificam para proteínas estruturais, principal e secundária do capsídeo, enquanto que os genes E (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam para proteínas com diversas funções reguladoras envolvidas na persistência viral, replicação de DNA e transcrição de genes virais e proliferação celular¹³.

O Comitê de Nomenclatura de Papilomavírus baseia a taxonomia viral em sistemas filogenéticos, que comparam o genoma viral completo ou fragmentos subgenômicos específicos. Portanto, Papilomavírus não são classificados por sorotipos

e sim por genótipos. O gene tardio L1 é o mais conservado, por isso é utilizado para identificação de novos Papilomavírus. É possível observar três níveis taxonômicos: gênero, espécie e tipo (Figura 3). Os gêneros são identificados por letras do alfabeto grego. Os HPVs relacionados com lesões anogenitais são designados Alfapapilomavírus. Este gênero é formado por 15 espécies¹⁴.

Figura 3 – Classificação dos Papilomavírus humanos. Os HPVs agrupam-se taxonomicamente na família *Papillomaviridae*. São divididos em cinco gêneros: Alfa, Beta, Gamma, Mu e Nupapilomavírus. Os tipos incluídos nos gêneros dos Alfapapilomavírus são classificados em cutâneos de baixo risco oncogênico e mucosos de baixo e alto risco oncogênico

FONTE: Modificado de de Villiers et al., 2004¹⁴

Os tipos relacionados à epidermodisplasia verruciforme (Betapapilomavírus) estão associados a lesões verrucosas características desta doença autossômica de caráter recessivo¹¹. Aproximadamente 40 tipos de HPV infectam a região anogenital, dos quais alguns relacionados às verrugas genitais classificados como HPVs de baixo risco oncogênico e outros denominados HPVs de alto risco oncogênico (HrHPV). Estes últimos pertencentes às espécies 6, 7 e 9 e epidemiologicamente associados ao desenvolvimento das lesões precursoras e do câncer do colo do útero¹⁴. O HPV é o único agente carcinogênico reconhecido que está envolvido no câncer genital¹⁵. O papel dos HrHPVs na gênese de todas as neoplasias malignas cervicais uterinas e em uma grande

parte das neoplasias vulvares, vaginais, perianais, do pênis, do canal anal e da cabeça e pescoço, encontra-se bem estabelecido¹⁶.

1.4 Proteínas virais

As proteínas E1 e E2, ambas envolvidas no controle da replicação viral, são as primeiras a serem expressas após o estabelecimento da infecção. E1 forma estrutura hexamérica com E2, promovendo abertura da hélice de DNA, expondo a fita modelo para a síntese de nova fita de DNA¹⁷. A proteína E2, também, é capaz de regular a transcrição dos genes virais precoces por se ligar a sítios específicos na LCR viral. Em baixos níveis, a E2 liga-se a estes sítios e ativa a transcrição dos genes adjacentes. Em altos níveis, a E2 inibe a transcrição dos genes precoces. Uma vez que os fatores de replicação E1 e E2 também são expressos como genes precoces, a habilidade da proteína E2 para ativar ou reprimir a expressão contribui para o controle do número de cópias virais nas células não diferenciadas¹⁸. O silenciamento ou interrupção do gene E2 leva a altos níveis de expressão de E6 e E7 nas células pela perda da função da proteína¹⁷.

A proteína E4, por ser capaz de associar-se ao citoesqueleto de queratina, acredita-se que esteja envolvida na maturação e liberação das partículas virais para o meio extracelular¹⁹.

A proteína E5 é uma proteína localizada, predominantemente, no complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Esta proteína é capaz de diminuir a expressão de moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) da classe I, o que poderia contribuir

para a evasão do vírus da resposta imune e favorecer o estabelecimento de uma infecção persistente²⁰.

As proteínas E6 e E7 são consideradas genuínas oncoproteínas virais sem similaridade com proteínas humanas. A proteína E6, em cooperação com E7, desempenha papel importante na imortalização e transformação das células²¹. A oncoproteína E6 é capaz de se ligar e induzir a degradação de inúmeras proteínas celulares, dentre as quais, a proteína supressora de tumor p53. A expressão de p53, normalmente, é ativada em resposta aos danos no DNA ou aos estímulos mitogênicos inapropriados, desempenhando importante papel na manutenção do genoma e da homeostase celular²². A meia vida da p53 está consideravelmente reduzida nas células infectadas pelo HrHPV. A E6 favorece a degradação de p53 pela via da proteólise, dependente da ubiquitina²². Por outro lado, a E6 é capaz de sequestrar a p53 no citoplasma, sem degradá-la, mas bloqueando sua atividade de fator de regulação em genes envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e senescência²².

A mais importante ação de E6 é a degradação de p53, mas interações com proteínas celulares são cruciais no processo de imortalização e transformação mediada pela E6 do HrHPV¹⁹. A oncoproteína E7, assim como a E6, é capaz de interagir com inúmeras proteínas celulares. Uma das interações mais bem definidas ocorre com a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (pRb) e com membros de sua família²².

A proteína pRb controla a transição do ciclo celular, desde a fase de crescimento da célula (G1) até a síntese de DNA (S) (G1-S), através da capacidade de regular a atividade de fatores de transcrição da família E2F, que está relacionada à ativação ou repressão dos genes relacionados com a progressão do ciclo celular, diferenciação, mitose e apoptose. Na sua forma hipofosforilada, no início da fase G1 em células

normais, a pRb liga-se ao fator de transcrição E2F e impede que este fator ative a transcrição de genes responsáveis pela síntese de DNA²².

A oncoproteína E7 tem capacidade de se ligar e degradar a pRb, favorecendo liberação de E2F e promoção da progressão do ciclo celular²³.

No epitélio normal, as células param de proliferar no início da diferenciação. Além de inativar a pRb, a proteína E7 também contribui para o processo de immortalização e transformação por interagir com proteínas essenciais ao controle de progressão de ciclo celular²⁴.

A expressão das proteínas L1 e L2, nas camadas mais superficiais do epitélio, permite a encapsulação do genoma e a produção de novos vírions infecciosos que são liberados através da descamação celular. A proteína L1, principal componente do capsídeo, é a proteína viral mais abundante correspondendo à cerca de 80% do total de proteínas virais. Contém epítomos tipo específicos e é altamente imunogênica¹³.

A proteína L2 é a proteína viral menos abundante e parece ter papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion²⁰. As vacinas profiláticas, em uso atual, são compostas por *virus like particles* (VLP), não possuindo o vírus vivo, atenuado ou mesmo o material genético viral. As VLPs são partículas similares ao capsídeo do vírus, formadas apenas por várias moléculas combinadas de proteína principal de capsídeo viral, L1²⁵.

1.5 Imunologia cervicovaginal e mecanismos de evasão viral do HPV

O sistema imune compreende mecanismos de defesa celulares e humorais do organismo. As respostas imunológicas são divididas em inata e adaptativa. A inata é compreendida por células e moléculas prontamente ativadas por patógenos em respostas rápidas e de especificidade baixa; a adaptativa inclui células que precisam ser ativadas por elementos da resposta inata, sendo, no entanto, mais lenta e mais específica²⁶.

De maneira geral, os principais elementos da resposta inata são os epitélios, moléculas como defensina e catelicidinas, neutrófilos, macrófagos (Mø), células *natural killer* (NK), proteínas do sistema complemento, colectinas, pentraxinas e citocinas que medeiam respostas celulares e controlam inflamação, como Interleucinas (IL)1 α e β , IL 10 e IL 12, fator de necrose tumoral (TNF) e interferons (IFN) tipo I²⁶. Na resposta adaptativa tem-se os linfócitos B, que produzem anticorpos e os linfócitos T, que apresentam mecanismos efetores diretos, como as células CD8, ou indiretos, mediante, por exemplo, a secreção de citocinas que ativam outros mecanismos efetores²⁶.

O trato genital inferior é revestido por epitélio escamoso estratificado até a cérvix, onde há uma transição para epitélio simples. As células epiteliais, que fazem parte da resposta inata do organismo, ligam-se umas às outras através de forte interação mediada por proteínas ligadas ao citoesqueleto, como zônulas de oclusão, impedindo a passagem de patógenos. Ainda, ligam-se por proteínas denominadas caderinas que fazem interações dependentes de cátions²⁶.

As células epiteliais expressam receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos. Os mais conhecidos são os receptores *toll-like* (TLR). Estes

receptores ativam vias de sinalização na célula, levando a aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da expressão da maquinaria de apresentação de antígenos²⁶.

Em células infectadas com HPV 16, observa-se expressão reduzida de TLR9, decorrente da inibição direta da transcrição do gene que codifica TLR9 pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV²⁷. Esta inibição pode ser um mecanismo de evasão viral importante.

A resposta celular antiviral é fundamental no controle das infecções virais. O principal mecanismo de resposta antiviral é mediado por IFN tipo I (IFN α e β). Esta citocina é produzida pelas células infectadas após ativação das vias de sinalização, como as disparadas por TLR e ativação de fator nuclear κB (NF κ B)²⁸. Interessantemente, estudos mostraram que a sinalização por IFN tipo I leva à aceleração do processo de integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira. Independentemente desse processo, também já se demonstrou que tanto E6 como E7 apresentam mecanismos para inibir a sinalização mediada por IFN tipo I, tanto pela inibição do fator regulador de Interferon (IRF) 3, como pelo recrutamento de histonas deacetilases para promotores ativados por IRF1²⁹.

No epitélio cervicovaginal, observam-se células dendríticas residentes localmente, denominadas células de Langerhans, além de Møs, neutrófilos e linfócitos intraepiteliais. Linfócitos TCD4 e TCD8 são os mais encontrados na mucosa cervical, sendo os CD8 os mais frequentes²⁶. As células apresentadoras de antígenos profissionais são as células dendríticas, os Møs e os linfócitos B. Essas células são capazes de apresentar antígenos, tanto pela via do Complexo Principal de

Histocompatibilidade (MHC) classe I, como pela via do MHC classe II, para linfócitos CD8 e CD4, respectivamente²⁶.

Os patógenos intracelulares obrigatórios, como os HPVs, são eliminados por indução da morte da célula hospedeira. Os linfócitos TCD8 reconhecem a célula-alvo e esta interação é feita pelo receptor de células T e do MHC classe I²⁶.

Em mucosas infectadas com HPV, observa-se redução das células de Langerhans em comparação com regiões adjacentes, livres de HPV. Queratinócitos que expressam oncoproteínas de HPV apresentam inibição da molécula de adesão E-caderina, molécula utilizada pelas células dendríticas para locomoção pelos epitélios. Com isso, o número de células dendríticas que poderiam apresentar antígenos das células infectadas é reduzido³⁰.

O ciclo de vida do HPV é um ciclo não lítico. Os *vírions* gerados numa infecção produtiva são liberados para o ambiente ao mesmo tempo em que as células descamam. Apresenta-se, desta forma, outro mecanismo de evasão viral³⁰.

Outra população de células importantes para apresentação do antígeno e modulação do fenótipo T é a de Møs, que são recrutados para tecidos, a partir do sangue onde circulam, como células imaturas denominadas monócitos. Padrões moleculares associados a patógenos ou fragmentos de proteínas do sistema complemento ativado podem induzir fenótipo citotóxico nos Møs conhecidos como Møs M1. Estes podem induzir ativação de linfócitos T, secreção de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio³¹.

Alternativamente, o microambiente para onde os monócitos são recrutados pode ser formado por substâncias anti-inflamatórias, favorecendo a diferenciação em Møs M2.

Estes, apresentam função homeostática local, não sendo bons indutores de resposta imune. Mais ainda, estes Møs M2 podem secretar citocinas anti-inflamatórias como Il-10 e fator de crescimento transformador (TGF) β que podem induzir respostas reguladoras em células T, em vez de resposta Th1³². Em modelo experimental demonstrou-se que tumores associados ao HPV 16 apresentam características de presença de Møs M2³³.

Embora haja um papel claro dos linfócitos TCD8 na eliminação das células infectadas por HPV, Herpes vírus e *Chlamydia trachomatis*, estas infecções são essencialmente controladas por linfócitos T, principalmente TCD4 Th1³⁴.

Tanto HPV como Herpes vírus apresentam mecanismos para reduzir apresentação de antígenos via MHC classe I³⁵.

O HPV apresenta vários mecanismos de evasão ao sistema imune. O ciclo infeccioso, por si só, é um mecanismo que favorece a evasão, pois não há viremia. Níveis muito baixos das proteínas virais são apresentados ao sistema imune, devido à infecção viral não ser citolítica. Replicação e empacotamento viral ocorrem em células já destinadas à morte natural. Não há inflamação para recrutamento do sistema imune. Associadamente, a resposta por interferon para a infecção por HPV, uma chave no mecanismo de defesa antiviral, é ativamente suprimida através das proteínas E6 e E7 dos HrHPV, inibindo os mecanismos, tanto de sinalização quanto os de ativação para os receptores dos genes de resposta a interferon³⁶. Adicionalmente, a proteína E7 regula negativamente TLR9³⁷. Desta forma, apresentam-se alguns dos mecanismos de evasão do HPV à resposta imune³⁸.

1.6 Patogenia e ciclo de vida viral

A infecção por tipos genitais de HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais comumente diagnosticada³⁹. Estima-se que 50 a 80% de homens e mulheres sexualmente ativos irão adquirir infecção por HPV (tanto de alto como de baixo risco) durante a vida. O período mais frequente de aquisição ocorre no início da atividade sexual^{40, 41} e o risco de infecção aumenta com o número de parceiros sexuais⁴².

HPV é altamente infeccioso, com período de incubação variando de 3 semanas a, até mesmo, anos. Este período de latência está relacionado, entre outros fatores, ao número de partículas virais presentes⁴³.

A fase de replicação viral também persiste por tempo variável, mas, eventualmente, a grande maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma efetiva resposta imune, com subsequente remissão clínica sustentada da doença. Atualmente, a infecção por HPV é determinada pela detecção do seu DNA e não pelo isolamento do vírus⁴⁴.

Uma minoria de mulheres variavelmente estimada em 10 a 20%, efetivamente, não elimina o vírus, mantendo-se positiva para o DNA viral; devido à infecção viral persistente, estas mulheres apresentam risco de progressão para lesões precursoras ou mesmo câncer invasivo do colo do útero⁴⁵.

Foram identificados, até o momento, aproximadamente 15 tipos de HrHPV. O HPV 16 é o tipo mais frequente encontrado em carcinomas cervicais invasivos, em cerca de 55% ou mais dos casos, seguido pelo HPV 18, encontrado em cerca de 12,8% ou

mais e, juntos, estes dois tipos são responsáveis por aproximadamente 70% dos cânceres cervicais invasivos, independentemente da localização geográfica^{46, 47}.

Os HPVs 33, 45 e 31 são, a seguir, os mais detectados no mundo, exceto na Ásia onde HPV 58 e 52, além do 33 são os tipos mais prevalentes. Adenocarcinoma do colo é causado em cerca de 48% por HPV 16, em 36% por HPV 18 e em 6% por HPV 45⁴⁸.

O espectro do HPV associado a câncer estende-se, atualmente, para carcinoma de células escamosas do ânus, das tonsilas e da base de língua, sendo o HPV o principal agente etiológico. Apresenta-se, também, como um significativo contribuinte para o carcinoma de células escamosas da vulva, vagina, pênis, e outras localizações da cabeça e pescoço⁴⁰.

Estima-se, além do mais, que HPV seja o agente causal em cerca de 5% dos cânceres humanos, sendo o HPV 16, o principal causador⁴⁰. Os HPVs de alto risco oncogênico são considerados agentes carcinógenos do tipo 1⁴⁹.

O ciclo de vida do HPV está intimamente ligado à diferenciação epitelial. A transmissão do HPV, normalmente, requer contato íntimo com pele ou secreção genital de membranas mucosas do parceiro com verrugas ou infectadas pelo vírus⁴⁵. Exceções são extremamente raras. Através de prováveis microlesões do epitélio genital durante o contato sexual, o HPV ganha acesso à camada basal do epitélio. Uma vez infectadas, estas células indiferenciadas tornam-se reservatório do vírus. Ao atingir o núcleo, o genoma viral permanece na forma episomal e ocorre ativação da transcrição dos genes precoces. Ocorre replicação do DNA viral, podendo-se encontrar, nesta fase, cerca de 50 a 100 cópias de DNA episomal por célula⁵⁰ (Figura 4).

Figura 4 – Ciclo de replicação do HPV. Através de microlesões, o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio estratificado. À medida que as células basais se diferenciam, os genes precoces E1 e E2 são expressos. Nas camadas mais diferenciadas, as proteínas do capsídeo são expressas e os vírions formados, liberados na superfície da mucosa, onde podem infectar outras células

FONTE: Adaptado de zur Hausen, 2002¹³

Nas lesões contendo o HPV na forma epissomal, a proteína E2 funciona como reguladora positiva ou repressora da síntese das proteínas da fase precoce do ciclo viral, incluindo E6 e E7. Descreve-se como passo fundamental para a carcinogênese, a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro, ocorrendo habitualmente através da interrupção do gene E2¹³.

Alguns estudos, no entanto, detectaram somente cópias epissomais em tumores cervicais, indicando que outros fatores podem influenciar no mecanismo da carcinogênese⁵¹.

Ocorrendo o processo de divisão celular o genoma viral vai sendo dividido entre as células filhas. Na medida em que a diferenciação celular progride até a camada

superficial, ocorre uma massiva expressão dos genes virais precoces E6 e E7, havendo amplificação dos números de cópias virais para, pelo menos, 1000 cópias por célula e, finalmente, expressão dos genes tardios L1 e L2. O DNA do vírus é, então, empacotado em novos capsídeos e a progênie viral liberada à medida que o epitélio descama¹⁹ (Figura 4). Este ciclo infeccioso ocorre em cerca de 2-3 semanas *in vivo*, tempo necessário para a célula basal diferenciar-se e atingir a camada superficial⁴³.

1.7 Principais fatores coadjuvantes à oncogenicidade do HPV

A vagina é um ecossistema onde há uma interação entre fatores microbiológicos, ambientais e do hospedeiro. Quando há um desequilíbrio, pode tornar-se vulnerável para invasão de agentes patogênicos e ocorrência de doença associada ao HPV⁵².

1.7.1 Imunossupressão

A importância do sistema imune no controle das infecções por HPV fica evidente quando se observam pacientes imunodeficientes. Estes apresentam maior risco de desenvolvimento de lesões malignas associadas ao HPV⁵². A imunidade efetiva consiste de resposta mediada por células para as proteínas precoces, principalmente contra E2 e E6, necessária para a regressão da lesão acompanhada ou seguida por soroconversão e produção de anticorpos contra a proteína principal do capsídeo, L1⁵³.

Quando a infecção viral se torna persistente, ocorrem altos níveis de expressão das oncoproteínas E6/E7, aumentando a chance de desenvolvimento de uma neoplasia, em células mitoticamente ativas⁵⁴.

1.7.2 Microbioma e Infecções associadas

Os primeiros a classificar o microbioma vaginal, estruturalmente, foram Ravel e colaboradores usando plataformas de sequenciamento⁵⁵. Baseados na presença de diferentes espécies de lactobacilos, ou na ausência destes, foram descritos cinco tipos de comunidades no microbioma vaginal (CST); CST I, II, III e V são dominadas por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus jensenii*, respectivamente e CST IV, inversamente, é um grupo caracterizado por depleção de *Lactobacillus spp.* com presença, estritamente, de espécies anaeróbias tais como: *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Sneathia* e *Prevotella*⁵⁵.

Vaginose bacteriana e microbioma tipo IV é uma alteração enigmática ocasionada por uma diversidade aumentada de espécies e redução de lactobacilos. A prevalência desta condição atinge cerca de 12% das mulheres australianas⁵⁶ e mais de 50% das mulheres na África Sub-Sahariana⁵⁷, tornando-se a mais prevalente alteração em mulheres na idade reprodutiva. Em 12 estudos de metanálise, a presença de vaginose bacteriana estava associada com taxas mais altas de infecção por HPV, sugerindo que um microbioma diverso e depletado de lactobacilos pode contribuir para a persistência do HPV⁵⁸.

A presença de outras infecções sexualmente transmissíveis pode contribuir para a progressão da lesão cervical uterina, associadamente à persistência do HrHPV⁵⁹.

Infecção por *Chlamydia trachomatis* parece aumentar o risco de infecção pelo HrHPV através de possível envolvimento na ruptura do epitélio associada à resposta inflamatória⁶⁰. Também, parece interferir na resposta imune, diminuindo o número de células apresentadoras de antígenos e diminuindo a imunidade mediada por células, desta forma, permitindo a persistência do HPV⁶¹.

1.7.3 Tabagismo

A nicotina e a cotinina, seu principal metabólito, são encontradas no muco cervical de mulheres e no sêmen de homens tabagistas⁶². Nitrosaminas, produzidas durante o ato de fumar, são conhecidas substâncias carcinogênicas⁶³.

Em células infectadas com HrHPV, estudos demonstram que o tabaco induz ao aumento na transcrição do oncogene E6, levando à diminuição dos níveis e da atividade da proteína p53^{64, 65}, facilitando a evolução da infecção por HPV para a fase de lesões precursoras do câncer cervical uterino⁶⁶.

Estudos demonstraram que vaginose bacteriana e microbioma CST IV estavam aumentados em mulheres tabagistas⁶⁷.

1.7.4 Anticoncepcional Hormonal

Alguns estudos referem que longo período de uso de contraceptivos orais combinados está associado com o desenvolvimento do câncer cervical uterino^{66, 68}. Os contraceptivos orais combinados estão associados com níveis aumentados de citocinas inflamatórias no colo⁶⁹. Inflamação aguda pode ter efeito protetivo contra aquisição de

infecções sexualmente transmissíveis, incluindo infecção por HPV, mas exposição crônica à inflamação pode ocasionar toxicidade celular, resultando em dano ao DNA e potenciais alterações celulares associadas ao processo de carcinogênese⁷⁰.

1.7.5 Paridade

A paridade foi associada a um risco aumentado de NIC 3 em comparação com lesões menos severas que NIC 2, com maior associação em mulheres com mais de três nascidos vivos⁶⁶.

1.8 Teste de Papanicolaou

Classicamente, a colpocitologia oncológica pelo método de Papanicolaou, teste de Papanicolaou (Pap), efetivamente, reduziu a mortalidade pelo câncer do colo do útero. Tanto incidência quanto mortalidade por este câncer, tiveram drástico decréscimo em vários grupos populacionais, quando da realização de bons programas de rastreamento. Redução da incidência e mortalidade eram proporcionais à intensidade do rastreamento^{71, 72}. O risco de desenvolver câncer invasivo é de três a dez vezes maior em mulheres que não são rastreadas^{71, 73}.

Constitui o Pap, o exame de rastreamento com a maior contribuição para o controle de um câncer específico, estimando-se uma redução de cerca de 80% na mortalidade por câncer de colo, decorrente deste exame⁷⁴.

Bons resultados são consequentes, em grande parte, de estratégias de detecção precoce baseadas em programas organizados, com altas taxas de cobertura populacional, avaliação sistemática de mulheres com exame alterado e eficiência no seguimento e tratamento de pacientes com lesões precursoras⁷⁴.

Um percentual grande de mulheres, principalmente as mais jovens, apresenta infecção transitória pelo HPV, com eliminação espontânea das células infectadas pelo vírus em período que pode variar de semanas a meses, sem o desenvolvimento de lesões epiteliais significativas⁷⁵. Cerca de 6% ou mais das mulheres com diagnóstico de NIC de baixo grau (NIC 1) evoluem para NIC de alto grau (NIC 2/NIC 3) e 10 a 20% de mulheres com NIC 3, evoluem para câncer invasivo⁷⁶. Cerca de 30% das biópsias com NIC 2/NIC 3 tem esfregaços citológicos normais e apenas um percentual muito pequeno de mulheres infectadas evoluirão para câncer⁷⁷.

A citologia oncológica apresenta limitações como resultados falso negativos, apesar da inquestionável contribuição dos exames citológicos e sucesso na prevenção do câncer cervicouterino; má qualidade das amostras e erros no preparo e na interpretação das lâminas, são alguns dos principais responsáveis pelas limitações na sensibilidade da citologia⁷⁸. Em diversos estudos, a sensibilidade da citologia em diagnosticar lesões de alto grau variou de 47% a 62% e a especificidade de 60% a 95%⁷⁷.

Estudo do Reino Unido detectou que 40% dos cânceres invasivos de colo ocorreram em mulheres que apresentavam citologias recentes com resultados negativos e com rastreamento adequado⁷⁹.

O teste cervicocitológico convencional é muito trabalhoso, tem baixa sensibilidade e baixa reprodutibilidade⁷⁹. É um exame mais subjetivo, requer rígido controle e programa de manutenção de qualidade para manter bom desempenho clínico, que

compreende desde coleta correta pelo profissional, fixação adequada do material, transporte adequado e, coloração e leitura das lâminas por citotécnicos e profissionais bem treinados⁸⁰.

Mesmo superados todos esses fatores anteriormente descritos, existem, ainda, desafios no diagnóstico pelo Pap a depender da idade e/ou infecções associadas⁸⁰.

Na citologia, células hipercromáticas agrupadas (HCGs), usualmente, representam entidades benignas, tais como células endometriais, metaplasia tubária, fragmentos de tecido endocervical (devido ao uso da escova endocervical) ou agregadas sinciciais em atrofia menopausal severa⁸¹. Contudo, ocasionalmente, HCGs representam lesões sérias como carcinoma *in situ* ou invasivo e neoplasia glandular *in situ* ou invasiva. A distinção entre essas várias entidades é, muitas vezes, extremamente difícil para o citopatologista⁸².

1.9 Citologia em base líquida

O *Food and Drug Administration* (FDA), desde a década de 1990, aprovou a metodologia da realização da citologia oriunda da base líquida (LBC) como alternativa à realização da citologia em lâmina convencional, com esfregaço cervical, no rastreamento do câncer do colo uterino^{83, 84}.

Alguns estudos referem que LBC não oferece melhora na acurácia para detecção de lesões pré-cancerosas de alto grau, quando comparada à citologia convencional⁸⁵; no entanto, há referências na literatura que LBC permite melhor avaliação e desempenho

dos citologistas, reduzindo a proporção de amostras insatisfatórias através da redução de elementos que dificultam o diagnóstico⁸⁶. Outro estudo, também, refere que proporção de casos insatisfatórios foi muito mais elevada em amostras convencionais do que na LBC⁸⁷. Ainda, o índice de positividade, praticamente, dobrou ao comparar os dois métodos citológicos (3% - Pap; 5,7% - LBC). A citologia em meio líquido parece ter maior acurácia diagnóstica nas doenças glandulares, pois a preparação permite fixar uma única camada de células, permitindo redução de falhas interpretativas⁸⁸. Nesse sentido, a LBC, além de representar a evolução técnica da citologia convencional, oferece um único meio de coleta que preserva os ácidos nucleicos e permite o transporte, armazenamento das amostras à temperatura ambiente e triagem em algoritmos que incluem o teste para detecção de HPV⁸⁷.

1.10 Teste de DNA-HPV

Conhecimento da história natural da doença e avanços nos métodos moleculares culminaram em novas formas de rastreamento, cujo alvo é o material genético do HPV, especificamente os de alto risco. Como resultado, programas de rastreamento não citológicos, envolvendo testes que detectam DNA e/ou RNA de HPV, têm sido utilizados em alguns países⁸⁹.

As principais vantagens dos testes de HPV sobre a citologia para rastreamento do câncer cervical uterino são: viabilidade com alto rendimento, maior objetividade em interpretação de resultados, alta sensibilidade e especificidade para detecção de HrHPV, alto valor preditivo negativo para detecção de lesão neoplásica e habilidade para prover

estratificação de risco a longo prazo. Além do mais, a realização e resultados dos ensaios para detecção do HPV são menos subjetivos entre os centros de realização^{90, 91}.

A sensibilidade descrita da citologia em detectar lesões, após o prosseguimento investigativo, varia de 33,8% a 94%, enquanto a detecção de HPV (ensaio captura híbrida), usado nas mesmas séries de estudo, em diversos continentes, varia de 84,9% a 97,6%. A maior sensibilidade dos testes de detecção de DNA do HPV em relação ao teste convencional é amplamente conhecida⁹².

O teste identifica o vírus e não a lesão (baixa especificidade e baixo valor preditivo positivo para lesão). O rastreamento inicial com teste de DNA de HrHPV, associado à citologia oncológica nas mulheres positivas, possibilita maior detecção das lesões de alto grau com maior especificidade em relação à colpocitologia, isoladamente⁹³. Como grande parte das infecções por HPV é transitória e muito prevalente em jovens, recomenda-se o teste para mulheres com idade superior a 30 anos⁹⁴.

A triagem citológica com alteração, realizada nos casos de HrHPV positivo, orienta o encaminhamento para colposcopia e realização do exame histopatológico, quando se fizer necessário⁹⁴.

Testes moleculares para detecção de HrHPV parecem ser opção na detecção de lesões de alto grau em programas de rastreamento populacional, mas podem induzir a grande número de colposcopias desnecessárias⁹⁵. Exame colposcópico, possível biópsia direcionada e diagnóstico histopatológico destas lesões requerem consulta profissional adicional e especializada e podem estar associadas a efeitos colaterais como ansiedade, dor, sangramento e disfunção sexual. Além do mais, associada, por vezes, ao protocolo do “ver e tratar” pode levar a procedimentos desnecessários e aumento da morbidade, inclusive no período gestacional⁹⁶.

Em mulheres submetidas a rastreamento citológico e com células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas (ASCUS) de repetição, triagem com teste para DNA de HrHPV parece oferecer abordagem custo-efetiva adequada, minimizando a indicação de colposcopias⁹⁷.

Identificou-se um grupamento especial de células alvo, na junção entre células escamosas e glandulares, denominadas células cuboidais, que são altamente suscetíveis à infecção por HrHPV⁹⁸. Os estudos da prevalência do HPV em doença glandular são em menor número. O DNA de HPV pode ser encontrado em 70 a 85% de adenocarcinoma *in situ* (AIS)⁹⁹. No entanto, outros estudos encontraram positividade de 95% para HrHPV nessa doença, sendo os genótipos 16, 18 e 45 os mais predominantes¹⁰⁰.

O manejo das anormalidades glandulares, em geral, é mais difícil e mais agressivo do que para outras alterações, devido ao risco de doença oculta como o câncer endocervical e endometrial. No entanto, a neoplasia escamosa é o diagnóstico mais comumente encontrado na avaliação destas pacientes¹⁰¹.

Adenocarcinoma (adenoca) e carcinoma escamoso do colo (CEC) parecem ter uma íntima associação patogênica. A frequente ocorrência de NIC detectada em 79% de tecido adjacente ao AIS foi uma notável observação. AIS foi detectado em 64% das pacientes que apresentavam anormalidades escamosas e em 27% com anormalidades glandulares. Cerca de 33% dos AIS estavam associados a NIC 3 e 9,5% a carcinoma escamoso invasivo⁹⁹; o rastreamento citológico tem baixa sensibilidade, possivelmente devido à dificuldade na obtenção de células do canal endocervical, não se realizando, desta forma, leitura das alterações glandulares, principalmente na mulher durante a

transição menopausal e na pós-menopausa. O difícil reconhecimento destas alterações pelo citopatologista, também é fator que deve ser considerado¹⁰².

O seguimento das atipias glandulares é realizado, tradicionalmente, através de repetição de citologias, colposcopia, biópsias dirigidas quando necessárias, curetagem endocervical e rastreamento endometrial. Condições benignas comuns como endocervicite, endometriose, hiperplasia microglandular, metaplasia tubária, amostra pós conização e pós radioterapia, pólipos endometriais, lesões térmicas, gravidez, endossalpingiose, efeitos hormonais exógenos, lesões escamosas que se estendem para endocérvice, dentre outras, podem resultar em atipias glandulares na citologia. Infelizmente, contudo, estes métodos têm uma substancial taxa de falsos negativos em lesões glandulares, tanto no diagnóstico primário, quanto no seguimento de pacientes tratadas¹⁰³.

A junção escamocolumnar (JEC) não é visível em alguns casos, classificando-se, nesta situação, a colposcopia como insatisfatória. Além do mais, a doença pode apresentar multifocalidade e localização em criptas glandulares profundas do canal endocervical, dificultando sua visualização¹⁰². Alguns estudos sugerem que mulheres com atipias glandulares sem outras especificações e HrHPV negativo (captura híbrida) podem ser seguidas clinicamente, evitando-se tratamento invasivo inicial¹⁰⁴. Por outro lado, a detecção de HrHPV em pacientes com atipias glandulares, nas quais não se observam achados colposcópicos anormais, pode ser ferramenta poderosa, identificando mulheres com alto risco para desenvolver lesões cervicais^{105, 106}.

Teste do HPV prediz persistência ou eliminação da infecção, diferentemente da citologia. Além do mais, demonstra melhor valor preditivo negativo (VPN) para lesão neoplásica. Combinação de citologia e teste do HPV tem sensibilidade de 90% e VPN

de 88,9% para detecção de lesões persistentes no primeiro controle pós tratamento excisional. Na segunda avaliação, cerca de 8 a 12 meses após tratamento, teste para HrHPV, juntamente com citologia, tem sensibilidade e VPN de quase 100%¹⁰².

1.11 Biomarcadores

O desenvolvimento de estratégias eficientes no manuseio de mulheres positivas para HrHPV é o principal desafio para a adoção do rastreamento primário com teste para HPV^{107, 108}. Várias opções são propostas nessa situação, visto a infecção pelo HPV ser muito prevalente e, na maioria das mulheres, transitória^{107, 108}. A detecção de HrHPV denota a presença do vírus, mas não diagnostica uma transformação neoplásica celular^{107, 108}.

O departamento americano FDA aprovou um algoritmo para o rastreamento primário que indica exame colposcópico para toda mulher que tenha HrHPV 16 ou 18 positivos (protocolarmente após os 30 anos de idade) e triagem citológica para aquelas positivas para os outros 12 genótipos de HrHPV¹⁰⁹. No entanto, este fluxograma apresenta limitações pela relativa baixa sensibilidade da citologia oncológica¹⁰⁹.

O entendimento de como o HPV age na transformação das células, traz a possibilidade do uso de biomarcadores como p16, adicionando eficácia maior na detecção de lesões precursoras ou detecção precoce do câncer cervical uterino¹¹⁰. Os biomarcadores são indicadores celulares do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo de desenvolvimento do câncer. Podem refletir

genotoxicidade, hiperproliferação, hiperplasia, alteração de padrões de expressão gênica, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com causas de câncer¹¹¹.

1.11.1 Proteínas p16/Ki-67

Os HPVs oncogênicos expressam precocemente proteínas E6 e E7, no ciclo viral, alterando o metabolismo da célula hospedeira, favorecendo o desenvolvimento das neoplasias⁴³.

O p16 é marcador direto da desregulação celular causada pela expressão dos oncogenes do HPV. Trata-se de um inibidor dependente da ciclinaquinase que regula a divisão celular em G1 e se torna inativada em inúmeros cânceres devido à deleção genética ou hipermetilação¹¹². A degradação da proteína pRb pela proteína E7 do HPV leva a aumento significativo de p16¹¹³.

O Ki-67 é um antígeno nuclear expresso somente em células em divisão durante o ciclo celular. Portanto, funciona como um marcador de proliferação celular¹¹³.

A detecção simultânea de p16 e Ki-67 é sinal de desregulação do ciclo celular e é considerada como sinal específico de transformação neoplásica¹¹⁴. O p16 possui atividade antiproliferativa, interrompendo o ciclo celular e o Ki-67 é encontrado em células em divisão. Em condições fisiológicas, a coexpressão dessas proteínas não ocorre^{113, 115}.

Estudos demonstram que sensibilidade e especificidade para positividade de p16 em mulheres HPV positivas e NIC 2, histologicamente confirmada, foi de 88% e 61%

respectivamente, proporcionando significativo aumento na sensibilidade comparativamente à citologia convencional e, sugerindo que sua presença seja realmente um marcador de progressão neoplásica, reforçando a aplicação da triagem da imunocoloração com p16/Ki-67 em mulheres HPV positivas¹¹⁶.

Metanálise de 17 estudos, avaliando p16 e teste para HPV em casos de ASCUS e lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) encontraram maior acurácia em casos de ASCUS correlacionados a NIC 2 e NIC 3, na colposcopia (apresenta melhor especificidade e semelhante sensibilidade) do que no teste para HPV. Nas pacientes com LSIL, p16 demonstrou maior especificidade, mas menor sensibilidade em relação ao teste para HPV¹¹⁶.

Em outro estudo em que se acompanharam 1042 mulheres infectadas com HrHPV e submetidas à pesquisa de p16 sem alteração citológica inicial, encontrou-se lesão NIC 2+ em 8,8% durante o seguimento em mulheres p16 positivas e 3,7% em mulheres p16 negativas. A sensibilidade longitudinal de p16 para detecção de lesões NIC 3+ foi de 77,8%, sugerindo superexpressão de p16 em lesões de alto grau ou câncer ou, mesmo, indicando desenvolvimento de lesões NIC 2+ no período de três anos em mulheres com HrHPV¹¹⁷.

Triagem de mulheres, na Holanda, com imunocoloração citológica resultou em risco cumulativo de NIC 3 em cinco anos, de 3,3% nas p16/Ki-67 negativas e em 3,6% nas mulheres com genotipagem HPV 16/18 negativas. No entanto, em cinco anos, comparando-se o grupo p16/Ki-67 negativo com o grupo em que não se utilizou esta triagem, encontrou-se resultado significativamente maior de NIC 3 (6,9%) neste último grupo. P16/Ki-67 detectou mais de 70% de NIC 3 oculta em mulheres HPV positivas com citologia normal, auxiliando na indicação de colposcopia¹¹⁸.

Alguns outros estudos encontraram sensibilidade e especificidade da dupla marcação citológica na detecção de mulheres com risco de desenvolver lesões de alto grau, ainda maiores que no estudo holandês¹¹⁹ e demonstraram resultados da dupla marcação p16/Ki-67 com positividade, aumentando gradativamente à medida que as lesões histológicas se tornavam mais graves (sensibilidade de 82% para NIC 2 e 93% para NIC 3)^{113,120}.

Wright e colaboradores demonstraram que dupla imunocoloração foi significativamente mais sensível do que citologia (74,9%, 51,9%, respectivamente) na detecção de lesões NIC 3+ em mulheres HrHPV positivas, enquanto especificidade foi comparável (74,1%, 75,0%)¹²¹, enquanto estudo norueguês, referiu que a sensibilidade do p16/Ki-67 foi significativamente maior para detecção de NIC 2/3, mas não em relação à NIC 3, especificamente em mulheres HrHPV positivas¹²².

Dupla marcação para p16/Ki-67 demonstrou comparável ou menor sensibilidade para NIC 2, mas níveis maiores de especificidade para ASCUS e LSIL comparativamente à detecção de HrHPV (captura híbrida). No entanto, valor preditivo positivo (VPP) para NIC 2 foi maior, principalmente em mulheres com idade menor que 30 anos^{113, 123}.

Estudo mexicano comparou diferentes estratégias de rastreamento do câncer cervical uterino. Resultados demonstraram que a pesquisa do HPV associada à triagem com p16/Ki-67 evidenciou-se menos onerosa e mais eficaz¹²⁴.

Outros estudos realizados identificaram duas proteínas, a superóxido dismutase de manganês, cujos altos níveis de expressão foram associados à gravidade de lesão ou câncer do colo uterino¹²⁵ e a alfa-manosidase, relacionada ao crescimento de alguns tipos de tumores¹²⁶.

1.11.2 Superóxido dismutase de manganês

O termo estresse oxidativo indica um desequilíbrio no balanço de redução/oxidação (redox) intracelular e reflete, tanto em alterações na produção e detoxificação de espécies oxidantes, quanto nas espécies que acumulam seus sítios de geração e nos aspectos temporais da formação de oxidantes. Esse desequilíbrio pode resultar no acúmulo de modificações oxidativas em biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos com consequente perda de suas funções e/ou acúmulo de mutações. Em sistemas biológicos, as espécies oxidantes mais relevantes são espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), formadas como subprodutos do metabolismo celular normal. Em condições fisiológicas, ROS são formadas principalmente durante o transporte de elétrons na mitocôndria e em reações enzimáticas.

O estresse oxidativo está diretamente envolvido no processo de transformação celular e desenvolvimento de diversas doenças que incluem câncer, dentre outras¹²⁷. No caso de células infectadas por HrHPV, o estresse oxidativo gerado pelo metabolismo anormal dos queratinócitos, que expressam as oncoproteínas virais e pela resposta inflamatória crônica efetiva, pode contribuir no processo de transformação celular. Ainda, as oncoproteínas E6 e E7 interferem nos mecanismos de reparo de lesões no DNA, favorecendo o acúmulo de mutações¹²⁷. Além disso, a instabilidade genômica promovida pelo estresse oxidativo pode favorecer a integração do HPV no genoma das células infectadas, principal causa da persistência viral e progressão de lesões ao câncer²². O aumento do estresse oxidativo favorece o acúmulo de danos ao DNA, além de alterar

vias de sinalização celulares que culminam em aberrações cromossômicas e transformação celular¹²⁸.

Alguns estudos demonstraram aumento de ROS e óxido nítrico sintetase em células infectadas com HPV ou que expressam as oncoproteínas virais E6 e E7¹²⁹.

Na maioria das células de mamíferos, as mitocôndrias são a fonte fisiológica mais relevante de ROS. A produção de ROS pode causar dano mitocondrial, encontrado em diversas doenças, mas também é importante na sinalização redox da mitocôndria para o resto da célula¹³⁰.

O sistema antioxidante controla o balanço entre a produção e a remoção de espécies oxidantes (ROS e RNS), sendo dividido em dois grupos, enzimático e não enzimático. O grupo enzimático é formado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, entre outras. O grupo não enzimático é formado por pequenas moléculas orgânicas produzidas pelo organismo ou mesmo provenientes da alimentação, tais como, vitamina C, vitamina E, ácidos graxos polinsaturados, entre outros¹³¹.

As proteínas pertencentes à família SOD são as principais enzimas antioxidantes envolvidas na metabolização de oxigênio. Essa família é constituída, em mamíferos, por três membros: superóxido dismutase dependente de cobre-zinco (localizada no citoplasma), superóxido dismutase dependente de manganês, codificada pelo gene SOD2 (localizada exclusivamente na mitocôndria) e superóxido dismutase extracelular (encontrada no meio extracelular)¹³².

A proteína SOD2 exerce um papel fundamental no estresse celular, catalisando a dismutação de radicais ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio,

contribuindo para a homeostase celular, prevenindo a inativação direta de biomoléculas^{133, 134}.

A redução do estresse oxidativo decorrente do aumento de expressão da proteína SOD2 poderia evitar lesões no DNA e, conseqüentemente, exercer efeito protetor no processo de carcinogênese. No entanto, o aumento da expressão de SOD2 em células neoplásicas as protegeria do potencial efeito citotóxico de ROS¹³². Observou-se correlação direta entre níveis aumentados de SOD2 e gravidade da lesão cervical uterina¹²⁵.

1.11.3 Alfa-manosidade

Além das células epiteliais infectadas com HPV, nos tumores encontram-se células inflamatórias como Møs, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, dentre outras. Os tumores associados ao HPV recrutam várias populações de leucócitos que parecem contribuir para a progressão da lesão e crescimento do tumor^{33, 135}.

Este conjunto, juntamente com matriz extracelular, moléculas solúveis como citocinas e fatores de crescimento, formam o microambiente tumoral. Este é importante no destino do tumor, facilitando seu crescimento através de fornecimento de nutrientes e sinais de sobrevivência ou ainda suprimindo o sistema imune³³.

Møs são células importantes para apresentação antigênica e modulação do fenótipo de células T. São recrutados para tecidos, a partir do sangue onde circulam, como células imaturas conhecidas como monócitos. Os Møs podem ficar nos tecidos na função de vigilantes teciduais (residentes não ativados). O contato com patógenos

dispara vias de sinalização que ativam os Møs residentes, fazendo com que estes aumentem sua capacidade de apresentação de antígenos e também secretem citocinas e produzam espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, podendo assumir função citotóxica, Møs M1, e induzir a ativação de linfócitos T³³. Alternativamente, o microambiente, para onde os monócitos são recrutados, pode ser formado por moléculas anti-inflamatórias como TGFβ, com papel homeostático tecidual. É possível, nesta situação, que se diferenciem nos Møs alternativamente ativados, Møs M2, apresentando função regulatória ou homeostática tecidual³³.

Møs com fenótipo M1 podem induzir ativação de linfócitos T. No entanto, Møs M2 não são bons indutores de resposta imune. Ao contrário, podem secretar citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGFβ, que podem induzir respostas reguladoras em células T em vez de resposta Th1²⁶. Neste sentido, linfócitos TCD4 Th1 secretam principalmente IL-2, IFN-γ e TNF-β. Linfócitos TCD4 Th2 secretam principalmente IL-4, IL -5, IL -6 e IL -10²⁶.

As alfa-manosidades (α-manosidades) são expressas no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e lisossomos, onde tem papel na adição e edição de oligossacarídeos a glicoproteínas, assim como na degradação de glicoproteínas, quando expressas em lisossomos. A atividade dessa enzima já foi relacionada ao crescimento de outros tipos de tumores que não da cérvix uterina e à indução de fenótipo M2 em Møs¹²⁶. A atividade da α-manosidase no câncer pode ter seu efeito nas células tumorais, por meio da migração e invasão através de glicoproteínas, bem como por meio das células do microambiente tumoral. Utilizando-se um inibidor farmacológico da α-manosidase, observou-se aumento de células mielóides supressoras¹³⁶. Estas células demonstraram ser responsáveis pela supressão de resposta de células T anti-tumorais. Com isto,

levantou-se a hipótese de que a atividade da α -manosidade poderia ter papel na progressão de tumores associados ao HPV, por possível ação na modulação de respostas inflamatórias nos tumores.

1.12 Autocoleta

Fatores relevantes já comentados, que dificultam o rastreamento do câncer do colo do útero, como a falta de infraestrutura de algumas regiões, dificuldade de acesso, necessidade de equipe de saúde especializada bem treinada, necessidade de múltiplas visitas da mulher para seguimento, dificuldade de implementação no controle de qualidade do procedimento e falta de recursos para prover o tratamento necessário são parâmetros que nos levam a procurar outros métodos que favoreçam o rastreamento do câncer cervical uterino¹³⁷.

Adicionalmente, algumas mulheres apresentam graus diferentes de dificuldade na coleta da citologia através do exame ginecológico convencional, particularmente em relação ao exame especular¹³⁸.

Estudos conduzidos em diversos países como Canadá e Finlândia têm demonstrado bom custo-efetividade dos testes moleculares na detecção de lesões de alto grau em programas de rastreamento populacional devido ao seu alto VPN (para presença de lesão) e sensibilidade alta¹³⁹. Além do que, podem ser realizados em material vaginal/cervical colhido pela própria mulher, denominando-se autocoleta¹³⁹⁻¹⁴¹.

Estudos têm demonstrado alta sensibilidade na detecção de HrHPV nos resultados de amostras de autocoleta comparados aos resultados de amostras coletadas

pelo profissional de saúde^{142, 143}. No entanto, outros estudos têm avaliado a acurácia de amostras HrHPV positivas para detectar doenças de alto grau do colo uterino e demonstram que a sensibilidade das amostras de autocoleta vaginal é muito grande, mas, por vezes, menor que em amostras coletadas pelo provedor de saúde^{144, 145}. No entanto, outros autores têm relatado que devido à multifocalidade da infecção pelo vírus e à alta concordância tipo específica no colo e vagina, os resultados na detecção do HPV 16 e HPV 18 assemelham-se na coleta pelo profissional de saúde e na autocoleta^{140, 141}. Por ser método menos invasivo, possui o potencial de aumentar o número de mulheres rastreadas para o câncer do colo do útero por conseguir incluir o rastreamento de mulheres não participantes de coleta convencional, através do exame especular^{146, 147}, seja por medo, vergonha, limitações funcionais, doenças articulares, doenças ortopédicas, doenças neurológicas, obesidade, razões culturais ou mesmo de ordem religiosa¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Dados da literatura em revisão sistemática, sobre aceitabilidade do procedimento de autocoleta mostraram que é método bem aceito e assim sendo, pode estimular maior participação de mulheres em programas de rastreamento do câncer cervical¹⁵¹.

Desta forma, o presente estudo propõe-se a avaliar a aceitabilidade da autocoleta, os biomarcadores p16/Ki-67, α -manosidase e SOD2, na citologia oriunda da autocoleta, comparando-a com a colhida por profissionais da saúde.

2 Objetivos

Avaliar a autocoleta vaginal no rastreamento do câncer do colo do útero.

2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a aceitabilidade da autocoleta;
2. Avaliar o resultado da citologia em meio líquido do grupo autocoleta com o do grupo profissional da saúde, com relação ao diagnóstico histopatológico;
3. Avaliar o resultado da pesquisa de HrHPV realizado pelo grupo autocoleta com o do grupo profissional da saúde;
4. Avaliar os resultados do biomarcador: dupla-coloração imunocitoquímica p16/Ki-67 colhido pelo grupo autocoleta e pelo grupo profissional da saúde, com relação ao diagnóstico histopatológico;
5. Avaliar os resultados dos biomarcadores: α -manosidade e SOD2 colhidos pelo grupo autocoleta e pelo grupo profissional da saúde, com relação ao diagnóstico histopatológico.

3 Métodos

3.1 Casuística

O estudo transversal envolveu 232 participantes com idade superior a 21 anos, que foram encaminhadas da rede pública de saúde com colpocitologia oncológica alterada e apresentavam indicação de exame colposcópico complementar, segundo as normas do manual de Diretrizes Brasileiras para Rastreamento do Câncer do Colo do Útero⁸.

As participantes foram atendidas no ambulatório de ginecologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) e no ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI) da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

As participantes foram recrutadas de forma sistemática, recebendo uma senha de atendimento, sendo incluídas alternadamente (par, ímpar), conforme chamadas, em um dos dois grupos de estudo, sem que os profissionais de saúde tivessem acesso prévio ao diagnóstico. Portanto, foram divididas, em dois grupos com 116 participantes em cada: a) grupo autocoleta (AC), grupo profissional da saúde (PS).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HU-USP (Anexo A) e Comitê de Ética do HC-FMUSP (Anexo B).

Todas foram incluídas após a leitura, a compreensão, a concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo C).

3.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: participantes provenientes da comunidade USP (HU) ou provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS) com resultado colpocitológico, de acordo com a classificação de Bethesda¹⁵² com alteração: células escamosas atípicas, não podendo afastar lesão de alto grau (ASCH); lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); lesão intraepitelial de alto grau, não podendo excluir microinvasão (HSIL NEMI); lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) (dois ou mais resultados consecutivos alterados, com intervalo mínimo de seis meses; resultado LSIL em imunossuprimidas); células atípicas glandulares, possivelmente não neoplásicas (AGC), células atípicas glandulares, não podendo afastar lesão de alto grau (AGCFN), adenocarcinoma *in situ* (AIS), carcinoma escamoso invasivo (CEC) ou adenocarcinoma microinvasivo ou invasor (Adenoca) e encaminhadas para o ambulatório de PTGI. Todas as participantes de ambos os grupos PS e AC apresentavam colpocitologia oncológica convencional (preservação celular, do esfregaço em lâmina, em álcool 70%) com uma ou mais alterações citadas acima, colhida por profissional de saúde.

Estruturou-se os dados de acordo com a seguinte classificação:

- NILM: negativo para lesão intraepitelial ou malignidade citológica: citologia convencional ou LBC com alterações celulares benignas inflamatórias

- BGM: baixo grau para malignidade citológica: citologia convencional ou LBC com ASCUS, AGC ou LSIL
- AGM: alto grau para malignidade citológica: citologia convencional ou LBC com ASCH, HSIL, AGCFN, HSILNEMI, AIS, Adenoca, CEC

3.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: mulheres com idade inferior a 21 anos, gestantes e mulheres não concordantes em participar do protocolo de pesquisa.

3.4 Grupos

Na primeira visita foi realizada a história clínica com coleta de dados clínicos e sociodemográficos (Anexo D).

As participantes do grupo PS foram submetidas a exame físico, ginecológico e coleta de material cervical, através do exame especular, para realização de citologia oncológica em base líquida, pesquisa de HrHPV e pesquisa de biomarcadores (p16/Ki-67; α -manosidade e SOD2). Em seguida, foram submetidas ao exame colposcópico e à biópsia dirigida, nos casos em que se encontrou achado colposcópico anormal. Após realizada a biópsia, o material foi encaminhado para estudo anatomopatológico (AP), no Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP/HU-USP.

As participantes do grupo AC, após a coleta de dados clínicos e sociodemográficos, receberam instrução verbal de como realizar o procedimento de

autocoleta e, também, folheto ilustrativo (modificado de Rovers®) com orientação para realização da autocoleta (Anexo E).

O procedimento de autocoleta foi realizado com escova estéril *EvalynBrush*® (da marca *Rovers*®-Oss, *The Netherlands*) (Figura 5).

Figura 5 – *Rovers*®; *EvalynBrush*®

Modificado de: *Trademarks of Rovers Medical Devices B.V. OSS, The Netherlands*

As participantes eram encaminhadas ao toalete ou ao espaço reservado na própria sala de exame, de acordo com sua preferência, para realizar o procedimento. Orientadas a introduzir a escova *Evalyn*® na vagina, conforme folheto ilustrativo, rodando esta por cinco vezes no mesmo sentido. Após retirada a escova, as participantes a encobriam com a tampa rosa e a entregavam ao profissional de saúde. Este material de autocoleta era, então, colocado no frasco, contendo líquido de preservação celular, onde

prosseguiu para a realização de LBC, pesquisa de HrHPV e pesquisa de biomarcadores (p16/Ki-67; α -manosidade e SOD2).

Após o procedimento da autocoleta, solicitava-se às participantes responderem ao questionário de aceitabilidade da autocoleta, incluindo em um dos itens sua preferência pela autocoleta ou coleta pelo profissional da saúde (Anexo F). Para uma melhor avaliação da aceitabilidade da autocoleta, dividiu-se a avaliação do questionário de aceitabilidade em três grupos etários: a) 21 a 29 anos; b) 30 a 49 anos; c) maior que 50 anos.

Em seguida, as participantes eram submetidas à colposcopia e à biópsia dirigida e, caso realizada, o material era encaminhado para estudo AP, no Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP/HU-USP.

As participantes do grupo AC que apresentaram, no retorno, pesquisa de HrHPV negativa foram reavaliadas pelo PS e submetidas à nova coleta de material para realização de nova pesquisa de HrHPV.

Os resultados histopatológicos encontrados nas biópsias dirigidas durante a colposcopia, nas excisões das zonas de transformação (ZT) anormais (ZTA), conizações ou nas curetagens do canal endocervical, nos casos de colposcopia insatisfatória (ZT não visível), foram o padrão-ouro para avaliação da sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados para detecção de doença precursora ou câncer.

Os dados dos resultados anatomopatológicos foram estruturados de acordo com a seguinte classificação:

- NLP: negativo para lesão precursora ou câncer no anatomopatológico: pólio endocervical, cervicite, colpíte e condiloma

- NIC 1: neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau
- NIC 2+: neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC 2/NIC 3), carcinoma microinvasivo, CEC, AIS, Adenoca

Abaixo, fluxograma representando resumo do método utilizado (Figura 6)

Figura 6 – Fluxograma com resumo do método

3.5 Citologia em base líquida

A coleta de material celular para a realização de LBC foi realizada pelo profissional de saúde através do exame especular e coleta do material cervical, com auxílio da espátula de Ayre e escova de cerdas plásticas (*Rovers®*).

Na autocoleta, a coleta de material celular foi realizada com auxílio da escova *Evalyn®*, segundo as orientações.

Em ambos os grupos, o material celular foi acondicionado em frascos com 10ml de líquido de preservação celular *BD SurePath™* (*Burlington, NC, USA*) e foi processado no Laboratório Diagnóstika – Unidade Diagnóstica em Patologia Cirúrgica e Citologia Ltda.

A composição celular foi obtida após um processo de homogeneização das células conservadas no frasco e um processo de enriquecimento, permitindo o aumento da concentração celular por centrifugação. As amostras consideradas satisfatórias foram aquelas que apresentavam cerca de 5000 células escamosas bem preservadas e bem distribuídas de forma homogênea na lâmina para que se pudesse realizar a análise, tanto por microscopia óptica como por método automatizado (quantidade mínima de células recomendada para leitura automatizada). A avaliação da zona de transformação e do canal endocervical torna-se viável com a presença de dez células distribuídas no esfregaço.

Ao depósito de células (*Pellet*) foi adicionado líquido conservante e o material foi fixado em uma lâmina especial com carga elétrica capaz de promover maior fixação. Na sequência a amostra foi submetida à coloração de Papanicolaou por método

automatizado (*Prepstain*). A sequência técnica ocorreu, utilizando-se a coloração pela hematoxilina (núcleo) e a coloração com corante EA e Orange G (citoplasma). Após, realizou-se a imersão em xilol (clarificação das células) e montagem das lâminas com verniz automotivo ou bálsamo do Canadá sintético.

A análise primária das amostras foi realizada através da *Focal Point Slide Profiler*. A avaliação celular foi realizada pela análise de múltiplos algoritmos, como análise isolada das células, análise de grupos celulares e intensidade de coloração dos núcleos celulares, comparando-a a uma escala que se baseia nas alterações presentes em amostras convencionais, identificando, assim, anormalidades nas amostras. O equipamento promove a seleção de 15% da amostra, contendo as alterações celulares a serem analisadas pelo *Focal Point GS Imaging System*, metodologia essa que, automaticamente, identifica as áreas com alterações morfológicas presentes na lâmina e assim, captura a imagem, transformando em imagens digitalizadas.

3.6 Exame colposcópico

A participante foi colocada em posição ginecológica. Colocou-se espéculo vaginal para exposição do colo do útero. Com auxílio de colposcópio, observaram-se o colo e as paredes vaginais, removendo-se excesso de muco ou corrimento. Uma solução de ácido acético a 2% foi aplicada no colo e vagina e, após dez segundos, quaisquer áreas atípicas foram mentalmente mapeadas. A solução de lugol (1% de iodo, 2% de iodeto de potássio e 97% de água destilada) foi utilizada a seguir para confirmar as áreas atípicas visualizadas com aplicação de ácido acético (teste de Schiller). As áreas acetobranças positivas ou áreas Schiller positivas (ausência de coloração com iodo), áreas suspeitas,

foram biopsiadas com pinça de Gaylor ou de Medina, à critério médico, de acordo com imagem colposcópica de gravidade. Este pequeno fragmento retirado foi colocado em frasco com formol à 10% e encaminhado para o setor de anatomia patológica para estudo histopatológico.

3.7 Procedimento Histológico

As biópsias e peças recebidas pelo Serviço de Anatomia Patológica em frascos, fixadas em formol a 10%, foram encaminhadas para exame macroscópico, constando medição, pesagem, descrição do espécime e cortes representativos.

Os cortes foram colocados em recipientes adequados e processados em aparelho próprio, onde receberam banhos de formol a 10% (fixação), álcool absoluto (desidratação), xilol (diafanização) e banhados com parafina. Após impregnados pela parafina, realizou-se a inclusão, ou seja, a confecção dos blocos. Os blocos gelados foram cortados em micrótomo histológico, na espessura de três micrômetros. Os cortes foram colocados em lâminas devidamente identificadas e levadas à estufa por aproximadamente dez minutos para fixação dos cortes. Em seguida foi realizada a coloração das lâminas com hematoxilina e eosina. Montadas e etiquetadas, foram encaminhadas para a leitura.

3.8 Detecção e genotipagem de HPV

Utilizou-se para detecção de HrHPV, metodologia denominada reação de polimerase em cadeia (PCR) tempo real, teste COBAS® 4800 HPV (Roche MTM *Laboratories AG*), cujo processamento foi realizado no laboratório de Biologia Molecular do Prédio dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas da FMUSP.

A preparação das amostras para o teste COBAS® 4800 HPV foi automatizada com a utilização do equipamento COBAS X 4800. As amostras colhidas em *COBAS® PCR Cell Collection Media*, *PreservCyt® solution* ou *Surepath™ Preservative Fluid* foram digeridas sob condições de desnaturação e temperaturas elevadas e depois lisadas na presença de reagente caotrópico. Os ácidos nucleicos HPV libertados, juntamente com o DNA da β globina que serve como controle do processo, foram purificados através da ablação das partículas de vidro magnéticas, lavados e finalmente separados destas partículas, tornando-os prontos para amplificação e detecção por PCR. Nesta técnica de PCR, o DNA alvo foi seletivamente amplificado através de ciclos repetidos de desnaturação, hibridização e extensão do *primer*.

O teste COBAS 4800 HPV baseia-se em dois processos principais: preparação automática de amostras para extrair simultaneamente DNA celular, amplificação por PCR de sequências do DNA alvo, usando pares de iniciadores complementares específicos para o HPV e a β -globina e detecção em tempo real das sondas de detecção oligonucleotídicas específicas para o HPV e a β -globina marcadas com o corante fluorescente e clivadas. A extração, amplificação e detecção simultâneas da β -globina no teste COBAS® 4800 HPV monitoriza o processo inteiro do teste. O reagente de

Mistura Principal do teste contém pares de iniciadores e sondas específicos para o DNA dos 14 tipos de HPV de alto risco e da β -globina.

A detecção de DNA amplificado (*amplicon*) é realizada durante o ciclo térmico, utilizando sondas oligonucleótidas marcadas com quatro corantes fluorescentes diferentes. Os sinais amplificados de 12 tipos de HPV de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) são detectados, utilizando o mesmo corante fluorescente, não discriminando, no laudo final, estes genótipos individualmente denominados como HPVs-outros tipos na presença de um ou mais destes genótipos presentes, enquanto que os sinais do HPV16, do HPV18 e da β -globina são cada um detectados com o seu próprio corante fluorescente específico, discriminados no laudo final como HPV 16 positivo ou negativo e ou HPV 18 positivo ou negativo. A análise da positividade ou negatividade foi feita, em tempo real.

3.9 Imunocitoquímica para detecção de p16^{INK4a}/Ki-67

Após preparação de lâmina no aparelho *Prepstain BD*®, seguiu-se a realização de testes de imunocitoquímica através de reação automatizada, utilizando-se o kit *CINtec PLUS Cytology*® (Roche MTM Laboratories AG, Cat # 605-100) em equipamento *Ventana BenchMark GX* (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), conforme instruções do fabricante.

Este *kit* permite determinar, qualitativamente, e de maneira simultânea, a presença das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 em amostras de citologia cervicovaginal. As proteínas foram detectadas, utilizando-se um coquetel de anticorpos primários que inclui

anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra a proteína humana p16^{INK4a} (clone E6H4TM) e anticorpo monoclonal de coelho dirigido contra a proteína humana Ki-67 (274-11 AC3).

Após o processo de recuperação antigênica, foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena, e incubação com o coquetel de anticorpos primários acima mencionado. O sistema de detecção utilizado foi composto por: anticorpo secundário anti-camundongo feito em cabra, marcado com peroxidase (para a detecção do anticorpo primário anti-p16^{INK4a}), cuja reação cromogênica com o 3,3'-diaminobenzidina (DAB) resulta na formação de precipitado marrom/acastanhado, que pode ser nuclear e/ou citoplasmático (Figura 7); anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra, marcado com fosfatase alcalina (para a detecção do anticorpo primário anti-Ki-67), cuja reação cromogênica com o *Fast Red* e fosfato de naftol resulta na formação de precipitado vermelho/rosa, de localização nuclear (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática da reação imunocitoquímica para p16^{INK4a}/Ki-67

As lâminas mostrando simultaneamente uma ou mais células epiteliais cervicais com imunocoloração citoplasmática marrom (p16) e imunocoloração nuclear vermelha (Ki-67) (Figuras 8 e 9) foram interpretadas como resultado positivo, independentemente da avaliação morfológica. As amostras que não apresentaram nenhuma célula com imunorreatividade dupla foram consideradas negativas.

De acordo com o sistema Bethesda, 2001¹⁵³ as lâminas que tinham menos de 5000 células escamosas bem preservadas e visualizadas foram consideradas inadequadas para avaliação. Contudo, espécimes que tinham células escamosas nucleadas insuficientes, mas que exibiam imunocoloração positiva para p16/Ki-67 eram reportadas como satisfatórias para avaliação e consideradas positivas. As lâminas submetidas à dupla coloração foram avaliadas e laudadas por citologista, que desconhecia a qual grupo pertencia a amostra, na FMUSP. Para análise, levou-se em consideração apenas as células representativas do epitélio escamoso e glandular.

As reações imunocitoquímicas para p16/Ki-67 foram realizadas no Laboratório de Inovação em Câncer/Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Figura 8 – Dupla marcação (p16/Ki-67), núcleo e citoplasma, em participante com HSIL

Figura 9 – Dupla marcação (p16/Ki-67), núcleo e citoplasma, em participante com carcinoma invasivo

3.10 Imunocitoquímica para a detecção de α -manosidase e SOD2

Após preparação de lâmina no aparelho *Prepstain BD*[®], seguiu-se a realização de testes de imunocitoquímica através de reação automatizada, utilizando-se o *ultraView Universal DAB Detection Kit*[®] (*Ventana Medical Systems, Inc., Roche, Tucson, Arizona*) em equipamento *Ventana BenchMark GX* (*Roche Diagnostics, Mannheim Germany*), conforme instruções do fabricante.

Para a detecção das proteínas-alvo foram utilizados anticorpos policlonais de coelho dirigidos contra a proteína α -1,2-manosidase (*ab 51262, Abcam, Cambridge, USA*) e contra a proteína SOD2 (*ab 13533, Abcam, Cambridge, USA*), nas concentrações de 1:75 e 1:2500, respectivamente. Após o processo de recuperação antigênica, foi realizada a inibição da atividade da peroxidase endógena, aplicação manual e incubação dos anticorpos primários acima mencionados. O sistema de detecção utilizado foi composto por um coquetel contendo anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho marcados com peroxidase, cuja reação cromogênica com DAB resulta na formação de precipitado marrom/acastanhado (Figuras 10 e 11).

As lâminas submetidas à pesquisa de α -manosidase e SOD2 foram avaliadas e laudadas por citologista, que desconhecia a qual grupo pertencia a amostra e que as classificava segundo critérios de coloração, em intensidade e extensão. A expressão era classificada como fraca (<10% de positividade), moderada (10% - 50% de positividade) e forte (> 50% de positividade). O *score* foi resultado da multiplicação da intensidade pela extensão. Para análise, levou-se em consideração, apenas, as células representativas do epitélio escamoso e glandular.

As reações imunocitoquímicas para α -manosidade e SOD2 foram realizadas no Laboratório de Inovação em Câncer/Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Figura 10 – Coloração positiva para α -manosidase, marrom acastanhada em núcleo e citoplasma, em aglomerado celular, em participante com HSIL

Figura 11 – Coloração positiva representativa para SOD2, marrom acastanhada em citoplasma, em participante com HSIL. Detalhe: aspecto focal, de outra área, com células fortemente coradas para SOD2, na mesma lâmina

3.11 Acompanhamento das participantes

Na visita de retorno, os resultados foram informados à participante e a conduta foi realizada de acordo com o fluxograma definido pelo manual das Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero⁸.

3.12 Análise estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva, resultando em tabelas de frequência para variáveis qualitativas que contaram ainda com a inclusão do intervalo de confiança para a proporção (IC95%). Estatísticas descritivas, incluindo média e desvio padrão, mediana e intervalo interquartil – IIQ (P25-P75) foram calculadas para resumir as variáveis quantitativas contínuas e discretas. As estatísticas de tendência central e de dispersão foram calculadas para as variáveis quantitativas. Gráficos de boxplot foram utilizados para explorar a distribuição da idade, segundo os diferentes desfechos relacionados ao questionário de aceitabilidade da autocoleta.

O teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher foi utilizado para comparação de dois grupos, no caso de variáveis qualitativas ordinais ou nominais. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da variável idade. Para avaliar a hipótese de que a distribuição da idade era semelhante entre as diferentes categorias dos seis desfechos analisados no questionário de aceitabilidade da autocoleta foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (KW).

O teste de Mann-Whitney (MW) foi usado para a comparação de dois grupos independentes no caso de variáveis quantitativas. O único pressuposto exigido para a aplicação do teste de MW é que as duas amostras sejam independentes e aleatórias, e que as variáveis em análise sejam numéricas ou ordinais. O teste de KW foi utilizado para avaliar a distribuição dos fatores ordinais em relação ao resultado anatomopatológico, classificado em três categorias. O teste é uma extensão do teste de MW e utilizado para comparar três ou mais populações; o método estatístico testa a

hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes. Quando significativa, as comparações múltiplas levaram em consideração o método de Bonferroni¹⁵⁴.

A avaliação diagnóstica dos fatores qualitativos ordinais (escores) foi realizada por meio da análise da curva ROC que, no plano unitário, resulta da representação gráfica dos índices de precisão especificidade *versus* sensibilidade, oriundas da variação do ponto de corte. Assim, a curva ROC é uma descrição empírica da capacidade e, conseqüentemente, da qualidade de um teste de diagnóstico diferenciar duas classes num universo^{155, 156, 157}. Em geral, uma área sob a curva (AUC) de 0,5 sugere ausência de discriminação (isto é, capacidade de diagnosticar pacientes com e sem doença ou condição baseada no teste), 0,7 a 0,8 é considerado grupo aceitável, 0,8 a 0,9 é considerado bom e mais de 0,9 é considerado excelente.

Os parâmetros diagnósticos avaliados foram: sensibilidade, probabilidade de que o resultado do teste seja positivo quando a doença estiver presente (taxa positiva verdadeira); especificidade, probabilidade de que o resultado do teste seja negativo quando a doença não estiver presente (taxa negativa verdadeira); *likelihood ratio positive* (LRP), expressa em quantas vezes o diagnóstico de uma doença se torna mais provável se o resultado do teste for positivo, ou seja, corresponde à taxa de probabilidade de um teste ser positivo na presença de doença sobre a probabilidade do teste ser positivo na ausência de doença; *likelihood ratio negative* (LRN), expressa em quantas vezes o diagnóstico de uma doença se torna mais provável se o resultado do teste for negativo, ou seja, corresponde à taxa de probabilidade de um teste ser negativo na presença de doença sobre a probabilidade do teste ser negativo na ausência de doença; VPP é a proporção de resultados de testes positivos que são verdadeiros positivos e expressa a

probabilidade condicional de um paciente com o teste positivo ter a doença; VPN refere-se à proporção de resultados negativos que são verdadeiros negativos e expressa a probabilidade condicional de um paciente com o teste negativo não ter a doença; a acurácia é a probabilidade global de que um paciente seja classificado corretamente¹⁵⁸.

Os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN são expressos como porcentagens e seus intervalos de confiança (IC) são calculados pelo método exato de Clopper-Pearson. Os ICs, para as razões de verossimilhança, são calculados com a utilização do método Log^{159, 160}.

O coeficiente kappa foi utilizado para avaliar concordância entre dois métodos quando nenhum deles era o padrão-ouro. Sugere-se os seguintes pontos de corte, segundo referência: valores maiores que 0,75 representam excelente concordância, valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana e os valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância¹⁶¹.

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0.05 e IC de 95% e foram realizados com apoio computacional dos *softwares IBM SPSS 23 (Statistical Package for the Social Sciences)* e *Excel 2010® (Microsoft Office)*.

4 Resultados

4.1 Aceitabilidade da autocoleta cervicovaginal

A avaliação considerou 116 mulheres do grupo autocoleta com média de idade de 36.2 ± 10.4 anos. A análise descritiva da quantidade de participantes pelos três estratos etários mostrou: a) ≤ 29 anos com 33 mulheres, 28,4% (IC95% 20,8%-37,1%); b) 30 – 49 anos com a maior parte das mulheres investigadas, 68 mulheres, 58.6% (IC95% 49,5%-67,3%); c) ≥ 50 anos com 15 mulheres, 12,90% (IC95% 7,8% -19,9%). A Tabela 1 mostra as variáveis sociodemográficas da coorte. Houve diferença significativa entre a idade da primeira relação precoce (≤ 16 anos) e tardia (> 16 anos) entre os três grupos, sendo a tardia (> 16 anos) no grupo com idade maior que 50 anos, que concentrou 93,3% (IC95% 72,8%-99,3%) das mulheres desta faixa etária. No grupo etário acima de 50 anos, houve maior número de mulheres na pós-menopausa com 73,3% (IC95% 48,3%-90,3%). Houve registro de uma paciente com insuficiência ovariana prematura no grupo de mulheres com menos de ≤ 29 anos. As demais variáveis foram homogêneas entre as categorias de idade, quando comparada à sobreposição do intervalo de confiança de 95% e não houve diferença estatística significativa (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise descritiva estratificada por idade, incluindo frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	≤ 29 anos		30 – 49 anos		≥ 50 anos	
	N	% (IC95%)	N	% (IC95%)	N	% (IC95%)
Idade de início da atividade sexual						
≤ 16 anos	20	60,6 (43,6-75,8)	31	45,6 (34,1-57,4)	1	6,7 (0,70-27,2)
> 16 anos	13	39,4 (24,2-56,4)	37	54,4 (42,6-65,9)	14	93,3 (72,8-99,3)
Paridade						
≤ 2 partos	21	63,6 (46,6-78,4)	25	36,8 (26,0-48,6)	4	26,7 (9,7-51,7)
> 2 partos	12	36,4 (21,6-53,4)	43	63,2 (51,4-74,0)	11	73,3 (48,3-90,3)
Número de parceiros sexuais na vida						
≤ 5 parceiros	21	63,6 (46,6-78,4)	36	52,9 (41,2-64,5)	11	73,3 (48,3-90,3)
> 5 parceiros	12	36,4 (21,6-53,4)	32	47,1 (35,5-58,8)	4	26,7 (9,7-51,7)
Método contraceptivo						
Hormonal	22	66,7 (49,7-80,8)	30	44,1 (32,8-56)	2	13,3 (2,9-36,3)
Não hormonal / não usa	11	33,3 (19,2-50,3)	38	55,9 (44-67,2)	13	86,7 (63,7-97,1)
Escolaridade						
Analfabeta / alfabetizada	15	45,5 (29,4-62,2)	25	36,8 (26-48,6)	10	66,7 (41,6-86)
Segundo grau completo / superior	18	54,5 (37,8-70,6)	43	63,2 (51,4-74)	5	33,3 (14-58,4)
Religião						
Católico	18	54,5 (37,8-70,6)	46	67,6 (56-77,9)	9	60 (35,3-81,2)
Não católico	15	45,5 (29,4-62,2)	22	32,4 (22,1-44)	6	40 (18,8-64,7)
Etnia						
Não Branca	16	48,5 (32,2-65,1)	31	45,6 (34,1-57,4)	5	33,3 (14,0-58,4)
Branca	17	51,5 (34,9-67,8)	37	54,4 (42,6-65,9)	10	66,7 (41,6-86,0)
Tabaco						
Não	26	78,8 (62,8-90,0)	47	69,1 (57,5-79,1)	12	80,0 (55,6-94,0)
Sim	7	21,2 (10-37,2)	21	30,9 (20,9-42,5)	3	20,0 (6,0-44,4)
Álcool						
Não	18	54,5 (37,8-70,6)	47	69,1 (57,5-79,1)	12	80 (55,6-94)
Sim	15	45,5 (29,4-62,2)	21	30,9 (20,9-42,5)	3	20 (6-44,4)
Menopáusia						
Não	33	100	68	100	4	26,7 (9,7-51,7)
Sim	0	-	0	-	11	73,3 (48,3-90,3)

Na Tabela 2 estão resumidos os dados de seis questões sobre a aceitabilidade do procedimento de autocoleta (1 - Entendimento do uso da escova de autocoleta, 2- Uso da escova de autocoleta, 3 - Desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta, 4 - Embaraçada ou envergonhada no uso da escova da autocoleta, 5 -Medo de machucar no uso da escova de autocoleta e 6 – Preferência de autocoleta *versus* coleta por

profissional de saúde. A maioria das mulheres relatou que as questões 1 (entendimento do uso da escova de autocoleta) e 2 (uso da escova de autocoleta) tiveram muito fácil ou fácil entendimento. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos etários. A maior parte das mulheres que declararam sua preferência pela autocoleta foram 76,70% (IC95% 68,40%- 83,70%); para outras 12,9% (IC95% 7,8%-19,9%) a coleta realizada pelo profissional de saúde foi a categoria de escolha; e para as demais mulheres, 10,3% (IC95% 5,8%-16,9%) o processo foi indiferente. A maioria das mulheres relataram que não houve vergonha ou constrangimento na questão 4 (embaraçada ou envergonhada no uso da escova da autocoleta), independentemente da faixa etária.

Houve diferença estatisticamente significativa na questão 5 (Medo de se machucar no uso da escova de autocoleta), com efeito de menor medo, conforme a idade aumentava; apenas uma mulher com idade ≤ 29 anos relatou muito medo, entre as que relataram medo, 71,4% tinham idade ≤ 29 anos; entre as que relataram pouco medo, a maior proporção, 42,9% foi observada na categoria 30 – 49 anos e, entre as que não tiveram medo, 65,5% estavam na categoria de 30 – 49 anos e 11,5% na categoria ≥ 50 anos ($p=0.025$). A questão 3 (Desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta) teve uma tendência semelhante, mas não houve significância estatística ($p=0.080$).

Tabela 2 - Análise estratificada da percepção da mulher sobre a escova, segundo estratos etários, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo (p-valor)

Estratagem utilizadas, incluindo frequências absolutas, relativas e intervalos de confiança (p-value)									
		≤ 29 anos		30 – 49 anos		≥ 50 anos		Total	p
		N	%	N	%	N	%		
1. Entendimento do uso da escova de autocoleta									
Muito fácil		16	28,1	36	63,2	5	8,8	57	0,591
Fácil		17	29,3	31	53,4	10	17,2	58	
Um pouco difícil		0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	
2. Uso da escova de autocoleta									
Muito fácil		9	22,5	27	67,5	4	10,0	40	0,378
Fácil		22	30,6	40	55,6	10	13,9	72	
Um pouco difícil		2	50,0	1	25,0	1	25,0	4	
3. Desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta									
Doloroso, desconfortável		0	0,0	6	100,0	0	0,0	6	0,080
Pouco doloroso, desconfortável		11	44,0	13	52,0	1	4,0	25	
Não é doloroso, desconfortável		22	25,9	49	57,6	14	16,5	85	
4. Embaraçada ou envergonhada no uso da escova de autocoleta									
Embaraçada/envergonhada		1	50,0	1	50,0	0	0,0	2	0,427
Pouco embaraçada/envergonhada		9	37,5	14	58,3	1	4,2	24	
Não me senti embaraçada/envergonhada		23	25,6	53	58,9	14	15,6	90	
5. Medo de se machucar no uso da escova de autocoleta									
Muito medo		1	100,0	0	0,0	0	0,0	1	0,025
Medo		5	71,4	2	28,6	0	0,0	7	
Pouco Medo		7	33,3	9	42,9	5	23,8	21	
Não tive medo		20	23,0	57	65,5	10	11,5	87	
6. Autocoleta x coleta por profissional de saúde (preferência)									
Autocoleta		27	30,3	49	55,1	13	14,6	89	0,769
Profissional de Saúde		4	26,7	10	66,7	1	6,7	15	
Indiferente		2	16,7	9	75,0	1	8,3	12	
Total		33	28,4	68	58,6	15	12,9	116	

A Tabela 3 mostra os motivos pelos quais as mulheres optariam por autocoleta ou coleta pelo profissional de saúde. Nenhum dos itens avaliados mostrou ter diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias. Contudo, dentre as participantes que preferiram autocoleta, praticidade foi a variável mais escolhida pelos três grupos etários, seguida por menos constrangimento nos grupos extremos etários e poder colher em casa/laboratório/unidade básica de saúde (30-49 anos).

Tabela 3 - Motivos que levariam a mulher a optar pela autocoleta ou pela coleta com profissionais de saúde, incluindo frequência absoluta, frequência relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	≤ 29 anos		30 – 49 anos		≥ 50 anos	
	N	% (IC95%)	N	% (IC95%)	N	% (IC95%)
Menos dor ou desconforto*						
Não	18	58,1 (40,6-74,1)	30	50,8 (38,3-63,3)	9	64,3 (38,5-84,9)
Sim	13	41,9 (25,9-59,4)	29	49,2 (36,7-61,7)	5	35,7 (15,1-61,5)
Menos vergonha ou constrangimento*						
Não	15	48,4 (31,6-65,5)	38	64,4 (51,7-75,7)	6	42,9 (20,3-68,1)
Sim	16	51,6 (34,5-68,4)	21	35,6 (24,3-48,3)	8	57,1 (31,9-79,7)
Praticidade*						
Não	12	38,7 (23,2-56,2)	24	40,7 (28,8-53,4)	3	21,4 (6,4-46,9)
Sim	19	61,3 (43,8-76,8)	35	59,3 (46,6-71,2)	11	78,6 (53,1-93,6)
Colher em casa/UBS/Lab*						
Não	21	67,7 (50,3-82,1)	28	47,5 (35,1-60,1)	8	57,1 (31,9-79,7)
Sim	10	32,3 (17,9-49,7)	31	52,5 (39,9-64,9)	6	42,9 (20,3-68,1)
Medo de não colher corretamente**						
Não	29	93,5 (80,9-98,6)	54	91,5 (82,4-96,7)	13	92,9 (71,2-99,2)
Sim	2	6,5 (1,4-19,1)	5	8,5 (3,3-17,6)	1	7,1 (0,8-28,8)
Confio mais no profissional de saúde**						
Não	29	93,5 (80,9-98,6)	53	88,3 (78,5-94,6)	14	100
Sim	2	6,5 (1,4-19,1)	7	11,7 (5,4-21,5)	0	-

* Variáveis respondidas pelas mulheres que optariam por autocoleta

** Variáveis respondidas pelas mulheres que optariam por coleta por profissional de saúde

Na tabela 4 há outra análise, entre as variáveis de desfecho, que avaliou a percepção da mulher em relação ao uso da escova. Embora o desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta tenha mostrado alguma heterogeneidade para distribuição de idade, nenhuma diferença significativa foi observada nesta análise. No Gráfico 1, estão representados os resultados de cada grupo etário em relação às respostas do questionário de 1 a 6.

Tabela 4 - Distribuição da variável idade, segundo as categorias de cada variável que avaliou a percepção da mulher em relação ao uso da escova, incluindo as medidas de tendência central, de posição e de dispersão

	Médi a	D P	Median a	P2 5	P7 5	p- valor
1. Entendimento do uso da escova de autocoleta						
Muito fácil	35	10	34	28	40	0.396
Fácil	37	11	36	27	42	
Um pouco difícil	44	-	44	44	44	
Difícil	-	-	-	-	-	
2. Uso da escova de autocoleta						
Muito fácil	36	9	34	30	41	0.871
Fácil	37	11	36	27	42	
Um pouco difícil	34	11	30	28	41	
Difícil	-	-	-	-	-	
3. Desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta						
Muito doloroso, desconfortável	-	-	-	-	-	0.081
Doloroso, desconfortável	39	6	37	36	42	
Pouco doloroso, desconfortável	33	9	31	26	35	
Não é doloroso, desconfortável	37	11	36	29	42	
4. Embaraçada ou envergonhada no uso da escova da autocoleta						
Muito embaraçada/envergonhada	-	-	-	-	-	0.308
Embaraçada/envergonhada	32	7	32	27	37	
Pouco embaraçada/envergonhada	33	8	32	27	39	
Não me senti embaraçada/envergonhada	37	11	36	29	42	
5. Medo de se machucar no uso da escova de autocoleta						
Muito medo	26	-	26	26	26	0.167
Medo	30	5	27	27	31	
Pouco Medo	37	13	35	25	42	
Não tive medo	37	10	35	30	42	
6. Autocoleta x coleta por profissional de saúde (preferência)						
Autocoleta	36	11	34	27	41	0.218
Profissional de Saúde	34	7	32	27	37	
Indiferente	40	10	42	33	46	

Gráfico 1 – Representação gráfica das respostas do questionário de aceitabilidade entre as mulheres, conforme a idade. A- distribuição de idade, segundo o item de entendimento do uso da escova de autocoleta; B - distribuição de idade, segundo o item uso da escova de autocoleta; C - distribuição de idade, segundo o item desconforto ou dor no uso da escova de autocoleta; D - distribuição de idade, segundo o item embaraçada ou envergonhada no uso da escova da autocoleta; E - distribuição de idade, segundo o item medo de se machucar no uso da escova de autocoleta; F - Distribuição de idade, segundo o item autocoleta *versus* coleta por profissional da saúde

Na análise multivariada sobre influência dos dados sociodemográficos sobre o questionário de aceitabilidade, o desfecho “entendimento do uso da escova de autocoleta” mostrou associação significativa com duas variáveis: a) paridade com 62% das mulheres, relatando uso muito fácil na categoria ≤ 1 parto ($p=0.011$); b) uso de álcool, as mulheres admitiram que o uso da escova foi muito fácil, nesse caso foram 64,1% das mulheres ($p=0.045$). Não houve diferença nos outros itens.

4.2 Associação entre análises citológicas, presença de HrHPV, achados colposcópicos, achados anatomopatológicos e biomarcadores

A avaliação considerou 232 mulheres, sendo que 116 (50%) foram alocadas de maneira sistemática no grupo de profissionais de saúde (PS) e as outras 116 (50%) constituíram o grupo de autocoleta (AC). No geral, a maioria das mulheres recrutadas no estudo eram brancas, 139 (59,9%), com segundo grau completo, 105 (45,7%); relataram não consumir tabaco, 168 (72,4%) e álcool 172 (74,1%); relataram não fazer uso de drogas, 228 (98,3%); referiram prática do sexo anal em 144 (62,1%) e uso de anticoncepcional hormonal combinado oral (AHCO) como método contraceptivo, 64 (27,6%). Entre os grupos, a maior heterogeneidade foi vista para o consumo de álcool, sendo que 38 (32,8% IC95%24,7%-41,6%) do grupo AC referiram uso social *versus* 21 (18,1% IC95%11,9%-25,8%), $p=0,010$ no PS (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise descritiva das características qualitativas estratificada de acordo com os grupos de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95% e nível descritivo

		Profissional da Saúde				Autocoleta				p-valor*
				IC95%				IC95%		
		n	%	Inferior	Superior	n	%	Inferior	Superior	
Raça										
	Branca	75	64,7%	55,7%	72,9%	64	55,2%	46,1%	64,0%	0,455**
	Amarela	2	1,7%	0,4%	5,4%	1	0,9%	0,1%	4,0%	
	Parda	31	26,7%	19,3%	35,3%	40	34,5%	26,3%	43,4%	
	Negra	8	6,9%	3,3%	12,6%	11	9,5%	5,1%	15,8%	
Tabaco										
	Não consome	83	71,6%	62,9%	79,2%	85	73,3%	64,7%	80,7%	0,370
	1 a 10 cigarros por dia	11	9,5%	5,1%	15,8%	8	6,9%	3,3%	12,6%	
	11 a 20 cigarros por dia	14	12,1%	7,1%	18,9%	9	7,8%	3,9%	13,7%	
	21 ou mais cigarros por dia	8	6,9%	3,3%	12,6%	14	12,1%	7,1%	18,9%	
Consumo de álcool										
	Não consome	95	81,9%	74,2%	88,1%	77	66,4%	57,5%	74,5%	0,010**
	Socialmente	21	18,1%	11,9%	25,8%	38	32,8%	24,7%	41,6%	
	duas vezes por semana ou mais	0	0,0%	-	-	1	0,9%	0,1%	4,0%	
Uso de drogas										
	Não	115	99,1%	96,0%	99,9%	113	97,4%	93,3%	99,3%	0,622**
	Sim	1	0,9%	0,1%	4,0%	3	2,6%	0,7%	6,7%	
Sexo anal										
	Não	37	31,9%	23,9%	40,7%	51	44,0%	35,2%	53,1%	0,078
	Sim	79	68,1%	59,3%	76,1%	65	56,0%	46,9%	64,8%	
Método anticoncepcional										
	Não usa	38	32,8%	24,7%	41,6%	23	19,8%	13,4%	27,8%	0,051**
	Preservativo masculino	19	16,4%	10,5%	23,9%	25	21,6%	14,8%	29,7%	
	AHCO	24	20,7%	14,1%	28,7%	40	34,5%	26,3%	43,4%	
	Progesterona oral/injetável trimestral	16	13,8%	8,4%	20,9%	12	10,3%	5,8%	16,9%	
	Injetável Mensal	3	2,6%	0,7%	6,7%	0	0,0%	-	-	
	Laqueadura Tubária	14	12,1%	7,1%	18,9%	11	9,5%	5,1%	15,8%	
	DIU de cobre	0	0,0%	-	-	1	0,9%	0,1%	4,0%	
	DIU de levonorgestrel	2	1,7%	0,4%	5,4%	2	1,7%	0,4%	5,4%	
	Vasectomia	0	0,0%	-	-	2	1,7%	0,4%	5,4%	
Grau de escolaridade										
	Não alfabetizado	2	1,8%	0,4%	5,5%	5	4,3%	1,7%	9,2%	0,473
	Alfabetizado	49	43,0%	34,2%	52,2%	46	39,7%	31,1%	48,7%	
	2º grau completo	54	47,4%	38,4%	56,5%	51	44,0%	35,2%	53,1%	
	Superior completo	9	7,9%	4,0%	13,9%	14	12,1%	7,1%	18,9%	

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado

**Valor de p baseado no teste exato de Fischer

Em relação às características quantitativas, no geral, as participantes apresentaram mediana de idade de 36 anos (intervalo interquartil - IIQ 29-43), idade da primeira menstruação, 13 anos (IIQ 12-14), idade na menopausa, 50 anos (IIQ 47-52), idade da primeira relação sexual, 16 anos (IIQ 16-18), com 2 gestações (IIQ 1-3), 1 parto (normal + cesárea) (IIQ 0-2) e 4 parceiros sexuais (IIQ 3-7). Entre os grupos, a variável que se mostrou heterogênea foi o número de parceiros sexuais, sendo que as participantes que compuseram o grupo PS tiveram uma mediana de 3 parceiros (IIQ 3-5) e as alocadas no grupo AC, 5 parceiros (II Q3-8), $p=0,001$. Foi verificado a existência de duas participantes *outliers*, uma com 300 parceiros no PS e outra com 200 parceiros no grupo AC. A diferença de quatro anos medianos com intervalo interquartil, variando de 30 a 45 anos para o grupo PS e 28 a 42 anos no grupo AC não caracterizou diferença significativa $p=0,05$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise descritiva das características quantitativas estratificada de acordo com os grupos de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo média, desvio padrão, mediana, intervalo interquartil (P25-P75) e nível descritivo

	Profissional da Saúde		Autocoleta		p-valor*
	Média ($\pm$ DP)	Mediana (P25-P75)	Média ($\pm$ DP)	Mediana (P25-P75)	
Idade na entrevista	39 ($\pm$ 12)	38 (30-45)	36 ($\pm$ 10)	34 (28-42)	0,050
Idade da menarca	13 ($\pm$ 2)	13 (12-14)	13 ($\pm$ 2)	13 (12-14)	0,991
Idade da menopausa	48 ($\pm$ 7)	50 (47-52)	49 ($\pm$ 4)	50 (47-52)	0,874
Idade da primeira relação sexual	17 ($\pm$ 3)	16 (15-18)	17 ($\pm$ 3)	17 (15-18)	0,097
Número de gestações	2 ($\pm$ 2)	2 (1-3)	2 ($\pm$ 2)	2 (1-3)	0,208
Número de partos	2 ($\pm$ 2)	1 (0-3)	1 ($\pm$ 2)	1 (0-2)	0,152
Número de parceiros sexuais	7 ($\pm$ 28)	3 (3-5)	8 ($\pm$ 19)	5 (3-8)	0,001

*Valor de p baseado no Teste U de Mann-Whitney

Na Tabela 7 é possível verificar a associação entre análises citológicas, presença de HPV, achados colposcópicos e achados anatomopatológicos estratificadas de acordo com grupo PS e AC; forte associação significativa ($p < 0,001$) foi observada entre citologia convencional, tanto no grupo PS quanto no AC, sendo que 84,7% dos casos classificados como AGM citológico foram classificados no resultado anatomopatológico como NIC 2+ no grupo PS e 89,9% seguiram essa concordância no grupo AC.

Embora fenômeno parecido tenha sido visto também no caso da citologia em base líquida para as categorias AGM citológica *versus* NIC 2+, a associação no grupo AC, embora significativa sob a óptica estatística, foi fraca quando comparada ao grupo PS ($p = 0,049$ *versus* $p < 0,001$). O ponto de maior discordância ocorreu na categoria citológica NILM da LBC que, no grupo PS distribuiu-se com 5 (41,7%) em NLP, 3 (25%) em NIC1 e 4 (33,3%) em NIC 2+, ao passo que no grupo AC ocorreu 8 (33,3%) em NLP, 1 (4,2%) em NIC1 e 15 (62,5%) em NIC 2+ (Tabela 7).

A presença de HPV de alto risco foi mais comum no grupo NIC 2+, com positividade semelhante e estatisticamente significante para ambos grupos PS ($p < 0,001$) e AC ($p < 0,001$). No grupo PS, 76,5% das participantes com HPV de alto risco positivo

foram classificadas com NIC 2+, ao passo que no grupo AC, esse percentual foi de 80%. HPV16 e HPV18 foram os mais comumente associados ao NIC 2+; 85,3% de todas as infecções por HPV16 foram detectadas nesses indivíduos no grupo PS e 86,5% no AC; já no caso de HPV18 - outros tipos, 69,9% ocorreram em NIC 2+ no PS e 75% no AC. A coinfeção HPV16 + HPV18, também ocorreu com frequência relativa semelhante (Tabela 7).

Outra maneira de verificar a relação da infecção por HPV e NIC 2+ é avaliando a prevalência de HPV de alto risco entre estas participantes com NIC 2+ que foi de 93,7% (n=80) no PS e 94,1% (n=85) no AC. Entre todas as situações possíveis analisadas, a situação mais comum foi a presença de HPV18-outros tipos, isoladamente, em 43,9% (43), seguida de HPV16 em 34,7% (34) e da coinfeção HPV18-outros tipos + HPV16 em 12,2% (12) no grupo PS e no grupo AC, HPV16 em 37,0% (37), seguida de HPV18-outros tipos em 36,0% (36) e da coinfeção HPV18-outros tipos + HPV16 em 18,0% (18) do total de indivíduos HrHPV+.

Os achados na colposcopia também apresentaram associação estatisticamente significativa com os achados anatomopatológicos ($p < 0,001$) nos dois grupos, além de mostrarem distribuição muito semelhante entre as categorias do anatomopatológico: 75% no grupo PS e 63,6% no grupo AC classificados como normais ou insatisfatórios, na colposcopia foram também classificados como NLP no anatomopatológico, ao passo que 94,7% classificados como achados maiores eram NIC 2+ (Tabela 7).

Tabela 7 – Associação entre análises citológicas, presença de HrHPV, achados colposcópicos e achados anatomopatológicos, estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo, estratificada de acordo com os grupos de profissionais da saúde e autocoleta

	Profissional de Saúde					Autocoleta					
	NLP	NIC 1	NIC 2+	Total	p-valor*	NLP	NIC 1	NIC 2+	Total	p-valor*	
	n (%)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)	n (%)			
Citologia convencional [‡]											
	<i>NILM</i>	8 (66,7%)	3 (25%)	1 (8,3%)	12		7 (63,6%)	0 (0%)	4 (36,4%)	11	
	<i>BGM</i>	6 (31,6%)	4 (21,1%)	9 (47,4%)	19	<0,001**	7 (26,9%)	7 (26,9%)	12 (46,2%)	26	<0,001**
	<i>AGM</i>	9 (10,6%)	4 (4,7%)	72 (84,7%)	85		4 (5,1%)	4 (5,1%)	71 (89,9%)	79	
Citologia em base líquida											
	<i>NILM</i>	5 (41,7%)	3 (25%)	4 (33,3%)	12		8 (33,3%)	1 (4,2%)	15 (62,5%)	24	
	<i>BGM</i>	7 (35,0%)	3 (15%)	10 (50%)	20	<0,001	5 (17,9%)	4 (14,3%)	19 (67,9%)	28	0,049
	<i>AGM</i>	10 (12,5%)	3 (3,8%)	67 (83,8%)	80		5 (8,1%)	6 (9,7%)	51 (82,3%)	62	
HrHPV											
	<i>Negativo</i>	9 (60,0%)	1 (6,7%)	5 (33,3%)	15	<0,001	8 (57,1%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	14	<0,001
	<i>Positivo</i>	13 (13,3)	10(10,2)	75 (76,5%)	98		10 (10%)	10 (10%)	80 (80%)	100	
DNA HPV16											
	<i>Negativo</i>	17 (27,7%)	7 (10,8%)	40 (61,5%)	65	0,025	14 (25%)	5 (8,9%)	37 (66,1%)	56	0,029
	<i>Positivo</i>	4 (8,3%)	4 (8,3%)	40 (83,3%)	48		4 (6,9%)	6 (10,3%)	48 (82,8%)	58	
DNA HPV18											
	<i>Negativo</i>	21 (20,2%)	9 (8,7%)	74 (71,2%)	104	0,368	17 (16,2%)	10 (9,5%)	78 (74,3%)	105	0,090
	<i>Positivo</i>	1 (11,1%)	2 (22,2%)	6 (66,7%)	9		1 (11,1%)	1 (11,1%)	7 (77,8%)	9	
DNA HPV outros tipos											
	<i>Negativo</i>	13 (23,2%)	4 (7,1%)	39 (69,6%)	56	0,443	12 (21,8%)	3 (5,5%)	40 (72,7%)	55	0,124
	<i>Positivo</i>	9 (15,8%)	7 (12,3%)	41 (71,9%)	57		6 (10,2%)	8 (13,6%)	45 (76,3%)	59	
Todos HrHPVs											
	<i>Negativo</i>	9 (60,0%)	1 (6,7%)	5 (33,3%)	15	0,011**	8 (57,1%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	14	0,016**
	<i>HPV 16</i>	3 (8,8%)	2 (5,9%)	29 (85,3%)	34		3 (8,1%)	2 (5,4%)	32 (86,5%)	37	
	<i>HPV 18</i>	1 (16,7%)	1 (16,7%)	4 (66,7%)	6		1 (33,3%)	0 (0%)	2 (66,7%)	3	
	<i>HPV-outros tipos</i>	8 (18,6%)	5 (11,6%)	30 (69,8%)	43		5 (13,9%)	4 (11,1%)	27 (75%)	36	
	<i>HPV16 + 18</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1		0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1	
	<i>HPV16 + Outros tipos</i>	1 (8,3%)	1 (8,3%)	10 (83,3%)	12		1 (5,6%)	3 (16,7%)	14 (77,8%)	18	
	<i>HPV18 + Outros tipos</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1		0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	3	
	<i>HPV16+18+Outros tipos</i>	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1		0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	2	
Colposcopia											
	<i>Normal/insatisfatória</i>	9 (75%)	0 (0%)	3 (25%)	12	<0,001**	7 (63,6%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)	11	<0,001**
	<i>Achados menores</i>	10 (40%)	9 (36%)	6 (24%)	25		7 (26,9%)	8 (30,8%)	11 (42,3%)	26	
	<i>Achados maiores</i>	2 (2,6%)	2 (2,6%)	72 (94,7%)	76		3 (4%)	1 (1,3%)	71 (94,7%)	75	

[‡]Na citologia convencional ambos grupos foram colhidos pelo profissional de saúde; *Valor de p baseado no teste de qui-quadrado; **Valor de p baseado no teste exato de Fischer

HPV – outros tipos: (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)

NILM – negativo p/ lesão intraepitelial ou malignidade; BGM – baixo grau p/ malignidade; AGM – alto grau p/ malignidade; NLP – negativo p/ lesão precursora; NIC 1 – neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIC 2+ – neoplasia intraepitelial de alto grau (NIC2/NIC3) ou CEC ou CA microinvasivo ou AIS ou Adenoca

Também foi possível verificar os parâmetros diagnósticos do HrHPV em geral e estratificados de acordo com os grupos. O padrão-ouro para essa análise foi o anatomopatológico, cuja categoria NIC 2+ foi a referência positiva. Acurácia geral observada foi 76,65% (IC95%70,60%-81,99%), sendo muito semelhante entre grupo AC 78,07% (IC95%69,35%-85,28%) e grupo PS 75,22% (IC95%66,22%-82,86%). Os VPP e VPN e de *likelihood* também foram muito parecidos, com sobreposições do IC de 95% em todas as situações (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros diagnósticos do HrHPV geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	Estimativa	IC95%
Geral		
Sensibilidade	93,40%	89,10%-97,60%
Especificidade	30,65%	19,56%-43,65%
LRP	1,35	1,14-1,61
LRN	0,20	0,10-0,40
VPP	78,28%	75,26%-81,03%
VPN	65,52%	48,35%-79,41%
Acurácia	76,65%	70,60%-81,99%
Profissional de Saúde		
Sensibilidade	93,75%	86,00%-97,94%
Especificidade	30,30%	19,59%-48,71%
LRP	1,35	1,07-1,70
LRN	0,21	0,08-0,56
VPP	76,53%	72,11%-80,44%
VPN	66,67%	42,53%-84,38%
Acurácia	75,22%	66,22%-82,86%
Autocoleta		
Sensibilidade	94,12%	86,80%-98,06%
Especificidade	31,03%	15,28%-50,83%
LRP	1,36	1,06-1,75
LRN	0,19	0,07-0,52
VPP	80,00%	75,70%-83,70%
VPN	64,29%	39,63%-84,15%
Acurácia	78,07%	69,35%-85,28%

LRP - Likelihood Ratio Positive

LRN - Likelihood Ratio Negative

VPP - Valores preditivos positivos

VPN - Valores preditivos negativos

O presente estudo se dedicou a avaliar a associação dos biomarcadores com o resultado anatomopatológico. Levando-se em consideração o escore do SOD2, observou-se diferença tênue ($p=0,049$) no grupo PS. Na comparação múltipla, diferença também tênue, mas significativa, foi observada entre a categoria NLP, cuja mediana foi

0, percentil 75 com mediana de 1 e percentil 100 com mediana de 2 em relação ao grupo NIC 2+, que contabilizou mediana de 1, percentil 75 de 4 e percentil 100 de 9 ($p=0,048$). Na categoria NIC 2+ a mediana do escore de SOD2 foi de 0 com percentil 75 de 1 e percentil 100 de 2 no grupo AC diferente estatisticamente do grupo de PS anteriormente descrito (Figura 12).

p-valor (Mann Whitney grupo PS versus AC)

p-valor (Kruskal-Wallis grupo PS): 0,049

p-valor (Kruskal-Wallis grupo AC): 0,465

Figura 12 - Distribuição do SOD2 escore de acordo com as categorias do anatomopatológico, estratificado de acordo com os grupos

A Figura 13 apresenta a avaliação de outro biomarcador, a α -manosidase que, contrariamente à avaliação do SOD2, mostrou-se distribuir diferentemente entre as

categorias do anatomopatológico apenas no grupo AC ($p=0,015$). Na comparação múltipla, as únicas categorias que mostraram diferença foi a NIC 2+, que contabilizou mediana de 0, percentil 75 de 2 e percentil 100 de 4 em relação a NLP, que apresentou mediana 0 com percentil 75 de 0,5 e percentil 100 de 2 ($p=0,015$).

p-valor (Mann Whitney grupo PS versus AC)

p-valor (Kruskal-Wallis grupo PS):0,202

p-valor (Kruskal-Wallis grupo AC):0,015

Figura 13 - Distribuição da α -manosidase escore de acordo com as categorias do anatomopatológico, estratificado de acordo com os grupos

No estudo da associação do p16/Ki-67, de acordo com as categorias do anatomopatológico para o grupo PS, a distribuição entre os positivos ficou mais concentrada no grupo NIC 2+, com 84,4% contra 6,5% em NIC1 e 9,6% em NLP; nesse estrato, no grupo de negativos, com 14 em NLP(51,9%), 2 em NIC1(7,4%) e 11 em NIC 2+(40,7%), as variáveis foram associadas significativamente ($p<0,001$). No grupo AC, o

fenômeno ocorreu com significância estatística ($p < 0,001$), sendo que entre os indivíduos positivos, a maior parte 53 (93%) estava concentrada em NIC 2+ e entre os negativos 22 (47,8%) estavam na mesma categoria (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação entre p16/Ki-67 estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo

	Profissional de Saúde					Autocoleta				
	NLP	NIC 1	NIC 2+	Total	p-valor*	NLP	NIC 1	NIC 2+	Total	p-valor*
	n (%)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)	n (%)		
p16/ki67										
Negativo	14 (51,9%)	2 (7,4%)	11 (40,7%)	27	<0,001	15 (32,6%)	9 (19,6%)	22 (47,8%)	46	<0,001
Positivo	7 (9,6%)	5 (6,5%)	65 (84,4%)	77		2 (3,5%)	2 (3,5%)	53 (93%)	57	

*Valor de p baseado no teste exato de Fischer

Além das análises já apresentadas, o estudo se propôs a verificar a associação das lâminas inadequadas para leitura, sem células representativas para avaliação (*out*) de acordo com o grupo de estudo (Tabela 10). Do total de itens perdidos na análise da manosiase, 78,6% ocorreram no grupo de PS e 21,4% no grupo AC, proporção que apresentou diferença significativa ($p = 0,020$) de maneira semelhante à análise das perdas de SOD2 ($p = 0,008$). No caso do p16/Ki-67, não foi observada diferença significativa ($p = 0,314$).

Tabela 10 - Associação entre lâminas inadequadas (*out*) para leitura, estratificada de acordo com grupo de profissionais da saúde e autocoleta, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo

		Profissional da Saúde		Autocoleta		p-valor*
		n	%	n	%	
Out manosidase						
Não	98	46,90%	111	53,10%	0,020	
Sim	11	78,60%	3	21,40%		
Out SOD2 2						
Não	98	46,70%	112	53,30%	0,008	
Sim	11	84,60%	2	15,40%		
Out p16 ki-67						
Não	105	50,50%	103	49,50%	0,314	
Sim	6	35,30%	11	64,70%		

*Teste exato de Fischer

Um escore final foi proposto com o objetivo de combinar pontos de maior qualidade diagnóstica entre os biomarcadores SOD2 e manosidase (fator qualitativo ordinal) com p16/Ki-67 (fator qualitativo nominal). O escore, então, foi feito por meio da soma dos escores de manosidase e SOD2, somando-se três para os indivíduos positivos para p16/Ki-67 ou menos três, se negativo. Na Figura 14, é possível verificar a superioridade do escore final em relação aos escores de SOD2 e manosidase por meio da análise da área sob a curva, cuja referência foi o anatomopatológico NIC 2+.

Figura 14 - Curva ROC para os escores de manosiidade, SOD2 e final geral e estratificada de acordo com grupo de profissionais da saúde e autocoleta

De modo geral, os três escores apresentaram significância no teste de hipótese de que AUC é superior a 0.5 (probabilidade de acertar o diagnóstico igual a 50%), contudo o escore final chegou próximo a 80% (IC95%71,9%-86,1%, $p < 0,001$). Ambos indicadores pareceram ter menor acurácia no grupo PS do que no grupo AC. O escore que teve menor variabilidade entre os avaliados foi o final, com AUC de 0,790 (IC95%0,719-0,861) no geral, 0,782 (IC95% 0,679-0,885) no grupo PS e 0,812(IC95%0,721-0,904) na AC (Tabela 11).

Tabela 11 - Área sob a curva ROC para os escores de manosidase, SOD2 e final geral e estratificada de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo nível descritivo e intervalo de confiança de 95%

	AUC	p-valor	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite inferior	Limite superior
Geral				
Manosidase escore	0,639	0,003	0,557	0,722
SOD2 escore	0,617	0,012	0,534	0,700
Final escore	0,790	<0,001	0,719	0,861
PS				
Manosidase escore	0,612	0,097	0,489	0,736
SOD2 escore	0,651	0,026	0,530	0,772
Final escore	0,782	<0,001	0,679	0,885
AC				
Manosidase escore	0,667	0,010	0,559	0,774
SOD2 escore	0,579	0,219	0,463	0,695
Final escore	0,812	<0,001	0,721	0,904

Na Tabela 12 é possível verificar as coordenadas da curva ROC; essas coordenadas representam o ponto em que as variáveis (medidas diagnósticas) foram padronizadas para classificação do grupo, com valores de sensibilidade e especificidade associados a cada ponto.

Tabela 12 - Coordenadas da curva ROC para os escores de manosidase, SOD2 e final geral e estratificadas de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo sensibilidade e especificidade

	Geral		Profissional de Saúde		Autocoleta	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
Manosidase Escore						
0,5	49,0%	77,4%	52,2%	68,0%	45,9%	85,7%
1,5	37,1%	81,1%	40,6%	72,0%	33,8%	89,3%
2,5	21,7%	96,2%	27,5%	92,0%	16,2%	100,0%
3,5	20,3%	96,2%	8,7%	96,0%	13,5%	100,0%
5,0	5,6%	98,1%	5,8%	96,0%	2,7%	100,0%
7,5	2,8%	98,1%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%
10,0	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%
SOD2 Escore						
0,5	49,0%	69,8%	47,8%	72,0%	36,5%	75,0%
1,5	35,7%	81,1%	36,2%	88,0%	24,3%	89,3%
2,5	28,0%	94,3%	34,8%	88,0%	20,3%	100,0%
3,5	26,6%	94,3%	8,7%	96,0%	18,9%	100,0%
5,0	7,0%	98,1%	5,8%	100,0%	5,4%	100,0%
7,5	3,5%	100,0%	0,0%	100,0%	1,4%	100,0%
10,0	0,0%	100,0%	-	-	0,0%	100,0%
Final Escore						
-2,5	90,9%	49,1%	100,0%	32,0%	82,4%	64,3%
-1,5	88,1%	56,6%	98,6%	36,0%	78,4%	75,0%
-0,5	86,0%	60,4%	-	-	75,7%	82,1%
0,0	-	-	97,1%	36,0%	-	-
0,5	84,6%	60,4%	-	-	73,0%	82,1%
1,5	81,8%	67,9%	92,8%	48,0%	-	-
2,0	-	-	-	-	71,6%	85,7%
2,5	81,1%	67,9%	91,3%	48,0%	-	-
3,5	57,3%	79,2%	66,7%	64,0%	48,6%	92,9%
4,5	49,7%	81,1%	58,0%	68,0%	41,9%	92,9%
5,5	37,1%	88,7%	52,2%	84,0%	23,0%	92,9%
6,5	33,6%	96,2%	46,4%	92,0%	21,6%	100,0%
7,5	22,4%	100,0%	27,5%	100,0%	17,6%	100,0%
8,5	18,2%	100,0%	21,7%	100,0%	14,9%	100,0%
9,5	14,0%	100,0%	-	-	12,2%	100,0%
10,0	-	-	15,9%	100,0%	-	-
10,5	12,6%	100,0%	-	-	9,5%	100,0%
11,5	7,0%	100,0%	8,7%	100,0%	-	-
12,0	-	-	-	-	5,4%	100,0%
12,5	5,6%	100,0%	5,8%	100,0%	-	-
15,5	-	-	-	-	1,4%	100,0%
14,5	2,8%	100,0%	4,3%	100,0%	-	-
17,0	1,4%	100,0%	1,4%	100,0%	-	-
19,0	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%	0,0%	100,0%

Os parâmetros diagnósticos para cada um dos biomarcadores SOD2 e manosidase (considerando ponto de corte 1,0), incluindo p16/Ki-67 e o escore final (considerando ponto de corte de 1,5) foram avaliados na Tabela 13. O que chamou atenção nas análises foi o desempenho do biomarcador p16/Ki-67, que se mostrou superior em sensibilidade [78,10% (IC95%70,70%-84,45%) *versus* manosidase 45,81% (IC95%37,79%-53,99%) e *versus* SOD2 44,51% (IC95%36,76%-52,46%)] e equivalente em especificidade [71,43% (IC95%57,79%-82,70%) *versus* manosidase 77,78%

(IC95%64,40%-87,96%) e *versus* SOD2 71,19%(IC95%57,92%-82,24%)] resultados que podem ser vistos tanto no geral quanto na análise por grupo.

Para análise do escore final foi proposto um ponto de corte, sendo $\geq 1,5$ positivo e $<1,5$ negativo. O novo escore resultou em uma acurácia um pouco mais elevada em relação àquela produzida pelo p16/Ki-67: 77,78% (IC95%71,49%-83,25%) *versus* 76,33% (IC95%69,94%-81,95%), contudo sem relevância estatística. No caso do grupo PS, a acurácia foi relativamente maior a favor do escore final, sem relevância estatística na comparação dos intervalos de confiança: 80,77% (IC95%71,87%-87,84%) *versus* 77,88% (IC95%68,69%-85,43%) e no caso do grupo AC, a acurácia foi exatamente igual. Outros parâmetros diagnósticos também foram apresentados na Tabela 14 e devem permitir melhor caracterização dos diferentes métodos.

Tabela 13 - Parâmetros diagnósticos dos biomarcadores manosidase, SOD2, p16/Ki-67 e final geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	Manosidase*		SOD2*		p16 Ki67		Final**	
	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%
Geral								
Sensibilidade	45,81%	37,79%-53,99%	44,51%	36,76%-52,46%	78,10%	70,70%-84,45%	81,46%	74,33%-87,31%
Especificidade	77,78%	64,40%-87,96%	71,19%	57,92%-82,24%	71,43%	57,79%-82,70%	67,86%	54,04%-79,71%
LRP	2,06	1,22-3,49	1,54	1,00-2,39	2,74	1,79-4,17	2,53	1,72-3,74
LRN	0,7	0,57-0,85	0,78	0,63-0,96	0,31	0,22-0,43	0,27	0,19-0,40
VPP	85,54%	77,73%-90,93%	81,11%	73,52%-86,91%	88,06%	82,86%-91,84%	87,23%	82,26%-90,97%
VPN	33,33%	28,98%-37,99%	31,58%	27,18%-36,34%	54,79%	46,21%-63,10%	57,58%	48,14%-66,49%
Acurácia	54,07%	47,06%-60,96%	51,57%	44,80%-58,29%	76,33%	69,94%-81,95%	77,78%	71,49%-83,25%
Profissional de Saúde								
Sensibilidade	50,00%	37,98%-62,02%	56,41%	44,70%-67,61%	85,52%	74,36%-91,68%	92,11%	83,60%-97,05%
Especificidade	69,23%	48,21%-85,67%	67,74%	48,63%-83,32%	59,26%	38,80%-77,61%	50,00%	30,65%-69,35%
LRP	1,62	0,87-3,02	1,75	1,01-3,02	2,07	1,30-3,30	1,84	1,26-2,68
LRN	0,72	0,51-1,02	0,64	0,45-0,91	0,26	0,14-0,48	0,16	0,07-0,37
VPP	81,82%	70,74%-89,33%	81,48%	71,82%-88,37%	85,53%	78,78%-90,39%	83,33%	77,44%-87,93%
VPN	33,33%	26,15%-41,38%	38,18%	30,32%-46,72%	57,14%	42,09%-70,98%	70,00%	49,87%-84,55%
Acurácia	55,10%	44,72%-65,17%	59,63%	49,81%-68,92%	77,88%	68,69%-85,43%	80,77%	71,87%-87,84%
Autocoleta								
Sensibilidade	42,17%	31,40%-53,51%	33,72%	23,88%-44,72%	70,67%	59,02%-80,62%	70,67%	59,02%-80,62%
Especificidade	85,71%	67,33%-95,97%	75,00%	55,13%-89,31%	85,71%	67,33%-95,97%	85,71%	67,33%-95,97%
LRP	2,95	1,15-7,57	1,35	0,67-2,73	4,95	1,97-12,40	4,95	1,97-12,40
LRN	0,67	0,53-0,86	0,88	0,68-1,15	0,34	0,23-0,50	0,34	0,23-0,50
VPP	89,74%	77,34%-95,73%	80,56%	67,14%-89,36%	92,98%	84,09%-97,08%	92,98%	84,09%-97,08%
VPN	33,33%	28,27%-38,81%	26,92%	22,09%-32,37%	52,17%	42,67%-61,53%	52,17%	42,67%-61,53%
Acurácia	53,15%	43,45%-62,69%	43,86%	34,58%-53,46%	74,76%	65,24%-82,80%	74,76%	65,24%-82,80%

LRP - Likelihood Ratio Positive

LRN - Likelihood Ratio Negative

VPP - Valores preditivos positivos

VPN - Valores preditivos negativos

*valor de cutoff=1,0

** valor de cutoff=1,5

Na Tabela 14 é possível verificar os parâmetros diagnósticos da LBC estratificada de acordo com os grupos. Vale lembrar que ambas variáveis foram binarizadas para a realização dessa análise; na citologia líquida, NILM e BGM compuseram o grupo negativo e AGM, o grupo positivo. Da mesma maneira, o anatomopatológico, cuja categoria NIC 2+ foi a referência positiva. Acurácia geral observada pela citologia líquida foi 68,14% (IC95%61,64%-74,16%), sendo essa relativamente mais elevada no grupo PS 75,89% (IC95%66,90%-83,47%) do que no AC 60,53%(IC95%50,94%-69,55%). O VPP foi semelhante entre os grupos, sendo 82,87% (IC95%76,15%-87,76%) para o PS *versus* 82,26% (IC95%73,83%-88,40%) do grupo AC.

Tabela 14 - Parâmetros diagnósticos da citologia em base líquida geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	Estimativa	IC95%
Geral		
Sensibilidade	83,10%	75,90%-89,80%
Especificidade	42,86%	32,11%-54,12%
LRP	1,45	1,19-1,78
LRN	0,39	0,25-0,61
VPP	71,08%	66,82%-75,01%
VPN	60,00%	49,13%-69,97%
Acurácia	68,14%	61,64%-74,16%
Profissional de Saúde		
Sensibilidade	83,75%	73,92%-91,05%
Especificidade	56,25%	37,66%-73,64%
LRP	1,91	1,28-2,87
LRN	0,29	0,16-0,52
VPP	82,87%	76,15%-87,76%
VPN	58,06%	43,58%-71,28%
Acurácia	75,89%	66,90%-83,47%
Autocoleta		
Sensibilidade	60,00%	48,80%-70,48%
Especificidade	62,07%	42,26%-79,31%
LRP	1,58	0,96-2,60
LRN	0,64	0,44-0,95
VPP	82,26%	73,83%-88,40%
VPN	34,62%	26,47%-43,77%
Acurácia	60,53%	50,94%-69,55%

LRP - Likelihood Ratio Positive

LRN - Likelihood Ratio Negative

VPP - Valores preditivos positivos

VPN - Valores preditivos negativos

A associação entre p16/Ki-67 e LBC ocorreu significativamente, tanto no caso dos grupos PS quanto AC, embora tenha sido mais forte no grupo AC ($p=0,006$ versus $p=0,040$) (Tabela 15). No grupo PS, 42,2% das mulheres com p16/Ki-67 negativo eram “não AGM” na citologia líquida, sendo que 60,9% tiveram o mesmo comportamento no grupo AC; por outro lado, 79,2% dos positivos no p16/Ki-67 foram também classificados como AGM na citologia líquida no grupo PS, fato que ocorreu em 66,7% no grupo AC. No grupo PS, o coeficiente kappa foi de 0,213 ($p=0,031$) e no AC de 0,275 ($p=0,005$). Ambas medidas consideradas de baixa concordância.

Tabela 15 - Parâmetros diagnósticos da citologia em base líquida geral e estratificados de acordo com grupo de profissionais de saúde e autocoleta, incluindo intervalo de confiança de 95% (IC95%)

	LBC Profissional de Saúde				LBC Autocoleta			
	Não AGM	AGM	Total	p-valor*	Não AGM	AGM	Total	p-valor*
	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)		
p16/ki-67								
Negativo	11 (42,3%)	15 (57,7%)	26	0,040	28 (60,9%)	18 (39,1%)	46	0,006
Positivo	16 (20,8%)	61 (79,2%)	77		19 (33,3%)	38 (66,7%)	57	

Não AGM- BGM + NILM

Coefficiente kappa PS: 0,213 (p=0,031).

Coefficiente kappa AC: 0,275 (p=0,005)

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado

4.3 Flora vaginal, presença de HrHPV e achados anatomopatológicos

No grupo AC, nenhuma característica específica de flora vaginal foi associada com grau de lesão. No grupo PS, observou-se uma associação limítrofe entre grau de lesão e flora indeterminada (p=0,05) (Tabela 16).

Tabela 16 - Distribuição da flora vaginal, segundo resultado anatomopatológico, descrita na citologia em base líquida

Flora vaginal	Perdas	Anatomopatológico		Valor de p ¹
		<NIC 2 n = 54 n (%)	NIC 2+ n = 169 n (%)	
Profissional da saúde	4	n = 29	n = 83	
<i>G.vaginalis</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>T.vaginalis</i> , <i>A israelii</i>				0,708
Não		22 (75,9)	60 (72,3)	
Sim		7 (24,1)	23 (27,7)	
<i>Cândida spp</i>				0,603 ²
Não		27 (93,1)	80 (96,4)	
Sim		2 (6,9)	3 (3,6)	
<i>Bacilo de Döderlein</i> , <i>f cocóide</i> , <i>f mista</i>				0,243
Não		9 (31,0)	36 (43,4)	
Sim		20 (69,0)	47 (56,6)	
<i>Flora indeterminada</i>				0,050
Não		29 (100)	73 (88,0)	
Sim		0	10 (12,0)	
<i>G. vaginalis</i>				0,577
Não		22 (75,9)	67 (80,7)	
Sim		7 (24,1)	16 (19,3)	
Autocoleta	5	n = 25	n = 86	
<i>G.vaginalis</i> , <i>C.trachomatis</i> , <i>T.vaginalis</i> , <i>A israelii</i>				0,673
Não		16 (64,0)	51 (59,3)	
Sim		9 (36,0)	35 (40,7)	
<i>Cândida spp</i>				0,959
Não		22 (88,0)	76 (88,4)	
Sim		3 (12,0)	10 (11,6)	
<i>Bacilo de Döderlein</i> , <i>f cocóide</i> , <i>f mista</i>				0,278
Não		10 (40,0)	45 (52,3)	
Sim		15 (60,0)	41 (47,7)	
<i>Flora indeterminada</i>				1 ²
Não		25 (100)	84 (97,7)	
Sim		0	2 (2,3)	
<i>G. vaginalis</i>				0,749
Não		16 (64,0)	52 (60,5)	
Sim		9 (36,0)	34 (39,5)	

¹Teste qui-quadrado de Pearson; ²Teste exato de Fisher.

G. vaginalis: *Gardnerella vaginalis*; *C. trachomatis*: *Chlamydia trachomatis*; *T. vaginalis*: *Trichomonas vaginalis*; *A. israelii*: *Actinomyces israelii*.

As evidências amostrais permitiram concluir que não existiu associação estatisticamente significativa entre a presença de HrHPV e presença de flora vaginal específica, encontrada na citologia em meio líquido, tanto no grupo PS quanto no grupo AC (Tabela 17).

Tabela 17 - Flora vaginal encontrada na citologia em base líquida e presença de HrHPV nas participantes do estudo

Flora vaginal	Perdas	HPV DNA		Valor de p ¹
		Negativo n = 54 n (%)	Positivo n = 198 n (%)	
Profissional da saúde	3	n = 15	n = 98	
<i>G.vaginalis</i> , <i>C.trachomatis</i> <i>T.vaginalis</i> , <i>A israelii</i>				0,582
Não		10 (66,7)	72 (73,5)	
Sim		5 (33,3)	26 (26,5)	
<i>Cândida spp</i>				1 ²
Não		15 (100)	93 (94,9)	
Sim		0	5 (5,1)	
<i>Bacilo de Döderlein</i> , <i>f cocóide</i> , <i>f mista</i>				0,614
Não		7 (46,7)	39 (39,8)	
Sim		8 (53,3)	59 (60,2)	
<i>Flora indeterminada</i>				0,620 ²
Não		13 (86,7)	90 (91,8)	
Sim		2 (13,3)	8 (8,2)	
<i>G. vaginalis</i>				0,219
Não		10 (66,7)	79 (80,6)	
Sim		5 (33,3)	19 (19,4)	
Autocoleta	2	n = 14	n = 100	
<i>G.vaginalis</i> , <i>C.trachomatis</i> <i>T.vaginalis</i> , <i>A israelii</i>				0,451
Não		10 (71,4)	61 (61,0)	
Sim		4 (28,6)	39 (39,0)	
<i>Cândida</i>				1 ²
Não		13 (92,9)	88 (88,0)	
Sim		1 (7,1)	12 (12,0)	
<i>Bacilo de Döderlein</i> , <i>f cocóide</i> , <i>f mista</i>				1 ²
Não		5 (35,7)	49 (49,0)	
Sim		9 (64,3)	51 (51,0)	
<i>Flora indeterminada</i>				1 ²
Não		14 (100)	98 (98,0)	
Sim		0	2 (2,0)	
<i>G. vaginalis</i>				0,493
Não		10 (71,4)	62 (62,0)	
Sim		4 (28,6)	38 (38,0)	

¹ Teste qui-quadrado de Pearson; ² Teste exato de Fisher.*G. vaginalis*: *Gardnerella vaginalis*; *C. trachomatis*: *Chlamydia trachomatis*; *T. vaginalis*: *Trichomonas vaginalis*; *A. israelii*: *Actinomyces israelii*.

Uma subanálise foi realizada para a presença de *Gardnerella vaginalis*, resultado AP e presença de HrHPV (Tabela 18). No grupo AC, 37,1% dos casos apresentou positividade para *G. vaginalis*, comparado com 21,6% no grupo PS, associação esta que foi estatisticamente significativa ($p=0,009$). Presença de resultado NIC 2+ e HrHPV não foi associada com presença de *G. vaginalis*.

Tabela 18 - Distribuição da *Gardnerella vaginalis*, grau de lesão e HrHPV nas participantes dos grupos autocoleta versus profissional de saúde

Variável	Perdas	Gardnerella		Valor de p ¹
		Não	Sim	
		n = 164 n (%)	n = 68 n (%)	
Grupo	0			0,009
Profissional da saúde		91 (78,4)	25 (21,6)	
Autocoleta		73 (62,9)	43 (37,1)	
Anatomopatológico	9			0,995
<NIC 2		38 (70,4)	16 (29,6)	
NIC 2+		119 (70,4)	50 (29,6)	
HPV DNA	5			0,803
HPV -		20 (69,0)	9 (31,0)	
HPV +		141 (71,2)	57 (28,8)	

¹ Teste qui-quadrado de Pearson.

5 Discussão

O presente estudo demonstrou alguns parâmetros importantes relativos à aceitabilidade do método de autocoleta pelas mulheres convidadas a participarem do estudo e ratificou alguns achados já publicados que enfatizam os benefícios do método de autocoleta, sobretudo como uma ferramenta importante para atingir populações refratárias a participarem dos eventos de rastreamento propostos em ações governamentais ou mesmo de ordem particular. Por diferentes motivos, há uma parcela da população feminina, que não participa dos rastreamentos e minimizar os impactos negativos dessa falta de aderência é um dos desfechos mais significativos do uso da autocoleta. O presente estudo foi realizado em hospitais universitários de atenção secundária e terciária à saúde; a maioria das mulheres participantes, independentemente da faixa etária, mostrou boa aceitabilidade do método e bom entendimento e facilidade para usar a escova de autocoleta. Além disso, um grande percentual de participantes que apresentava experiência prévia do rastreamento convencional, realizado através do exame especular por profissional da saúde, optou pela autocoleta como método preferido para a realização do rastreamento. Por outro lado, um menor número de mulheres preferiu continuar com o rastreamento pelo profissional de saúde ou referiu ser indiferente ao tipo de método utilizado. Vários estudos de diferentes países relatam a influência de aspectos culturais, religiosos, emocionais e/ou sociodemográficos de diferentes grupos étnicos, assim como convicções pessoais na aceitação da autocoleta vaginal^{151,162-164}. Apesar da influência destes fatores, uma metanálise recente, abrangendo 37 estudos, envolvendo 18.516

mulheres de 24 países em cinco continentes, reforça a significativa aceitação da autocoleta e a notória preferência das mulheres por esta nas diferentes comunidades estudadas¹⁶⁵. Na fração da população brasileira, avaliada em nosso estudo, esse pressuposto é semelhante. Devido à grande população feminina de nosso país em idade para participação em eventos de rastreamento do câncer do colo do útero e, também, das imensas diferenças socioculturais de nosso povo, nossos dados estarão sujeitos a confirmação em outras comunidades ao longo do território nacional.

Uma característica essencial para aderir a um novo método, como a autocoleta, é adequação do mesmo no contexto clínico e facilidade de compreensão. O conhecimento prévio sobre o método pode, também, influenciar na decisão da mudança, podendo atuar desfavoravelmente quando as mulheres estão confortáveis com o método usual ou favoravelmente quando desejam mudanças por diversos motivos, sejam eles culturais, sociais, emocionais ou quando há vergonha, medo ou mesmo desconforto na coleta cervicovaginal durante a consulta médica. Por esta razão, a autocoleta pode apresentar-se, principalmente nestas mulheres, como uma opção metodológica para auxiliar no rastreamento do câncer do colo do útero¹⁶⁶. O grande percentual dos carcinomas cervicais ocorre em idade reprodutiva com pico de incidência entre 45 e 50 anos. A Organização Mundial da Saúde recomenda que mulheres com idade entre 30 a 49 anos sejam rastreadas, preferencialmente com testes que detectem HrHPV, devido ao maior risco de câncer cervical nesta faixa etária⁶. Entretanto, recentemente, as taxas de rastreamento do câncer cervical em mulheres entre 25 e 29 anos em países europeus têm diminuído¹⁶⁷. Desta forma, optamos, para melhor avaliar a aceitabilidade da autocoleta nas diferentes faixas etárias, por dividir as participantes em três grupos etários, a saber: de 21 a 29 anos, de 30 a 49 anos e acima de 50 anos.

Utilizamos, ainda, um folheto ilustrativo, orientando a realização do procedimento de autocoleta associado à elucidação de eventuais dúvidas através da disponibilização do profissional médico para auxiliar no esclarecimento. Consideramos que esse pode ter sido um dos recursos que auxiliaram o bom entendimento e facilidade no uso do método em nosso estudo. Em outros relatos, as mulheres, também, referiram preferência por autocoleta à coleta pelo profissional médico, desde que fossem adequadamente instruídas de como coletar as amostras¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. O receio de não proceder à coleta adequadamente pode ser um dos fatores que diminua a aceitação da autocoleta como foi descrito em outros estudos¹⁷¹⁻¹⁷². Este sentimento negativo, de coleta inadequada, não se confirmou na quantidade de material obtido nas amostras, pois a maioria dos casos apresentaram material adequado para estudo, o que vem de encontro aos relatos de outros autores¹⁷³⁻¹⁷⁵. O medo de provocar algum tipo de ferimento, desconforto ou dor na utilização da escova, também, podem ser fatores que diminuam a aceitação da autocoleta¹⁷¹⁻¹⁷². Na maioria das mulheres do nosso estudo, não documentamos esses receios mencionados anteriormente, o que salientamos ser um achado promissor para futuras ações de prevenção.

Estudo realizado em locais de pouco recurso demonstrou parcial aceitabilidade pela autocoleta. Aproximadamente metade das mulheres, que não quiseram participar e que foram entrevistadas por este motivo, referiam medo de se machucar durante o uso da escova de autocoleta, sendo que, aproximadamente um quarto delas tinha receio de deixar cair a escova durante o procedimento com consequente perda da coleta¹⁷⁶. Além disso, participantes do estudo referiam que as principais preocupações em realizar o rastreamento eram medo de ser diagnosticadas com pré-câncer ou câncer, ter de afastar-se do trabalho ou de casa para realizar o procedimento e, mais preocupante, não saber se seria realmente necessário participar do rastreamento por não apresentarem

qualquer sintoma ou sinal de doença¹⁷⁶. Esses comentários colocam em evidência a real necessidade de um constante trabalho de esclarecimento sobre as razões de participação em programas de rastreamento.

Neste sentido, muitas das participantes dos grupos etários mais avançados já tinham experiência prévia na participação em rastreamentos para o câncer cervical, tendo maior consciência da importante necessidade de participação como fator preventivo. Além disso, a facilitação no agendamento e no transporte, bem como disponibilização de tempo para a consulta são advogados como fatores relevantes na obtenção de bons resultados nas estratégias de prevenção¹⁷⁶. Salienta-se, entretanto, que estes são alguns dos muitos aspectos que devem ser observados para estabelecer uma relação de confiança e facilitar a acessibilidade das mulheres e, consequentemente, aumentar o número de participantes no rastreamento. Estes achados são particularmente importantes, dado que a realização de um único teste de detecção do DNA de HPV de alto risco oncogênico aos 35 anos de idade tem o potencial de reduzir em 36% o risco de câncer cervical durante a vida¹⁷⁷. Portanto, confiança na coleta e confiabilidade no teste são barreiras importantes a serem vencidas para se obter maior adesão deste instrumento para detecção do HPV¹⁷⁸.

Um achado interessante em nosso estudo foi observarmos que as mulheres mais jovens referiram ter mais medo e desconforto no procedimento de autocoleta. Parece paradoxal, mas há relatos na literatura de que jovens seriam mais céticas e desconfiadas do que mulheres mais velhas¹⁷⁹. Esta diferença no ceticismo relacionado à idade, sugere que diferentes grupos etários podem requerer diferentes orientações para o rastreamento pela autocoleta, com instruções claras e factuais, em relação à detecção do HPV, assim como ações educacionais atraentes nas gerações mais jovens¹⁷⁹. Além

disso, é importante ter-se em conta que se deve adaptar a linguagem a ser usada nesta população mais jovem e em populações com características culturais muito distintas da maioria da população. Segundo alguns, o uso de aplicativos em *smartphones* e mensagens de texto com linguagem concisa pode facilitar a aceitação da autocoleta¹⁸⁰.

Nosso estudo, à semelhança de outros, não encontrou diferença cultural ou barreira religiosa em relação à autocoleta^{172,181}. Entretanto, um estudo no Reino Unido encontrou relutância entre mulheres muçulmanas¹⁶⁸, da mesma forma que estudo com mulheres indígenas mexicanas¹⁸² em relação a este tipo de procedimento.

Na análise das influências clínicas que foram realizadas para cada um dos desfechos, as participantes que referiram ingesta alcoólica classificavam ser muito fácil, tanto o entendimento no uso, quanto ao uso da escova, tão somente. Pode-se especular que a ingesta de bebida alcoólica tenha um papel complexo na sociedade e, dada à percepção negativa que nossa sociedade tem do uso do álcool, as mulheres que, ocasionalmente ou frequentemente, consomem bebidas alcoólicas, presumivelmente, tenham um comportamento mais liberal e sejam mais propensas a aceitar novos desafios ou procedimentos nas suas vidas. Em uma diferente perspectiva, há relatos de adolescentes que referem redução de ansiedade e medo relacionados a novos desafios, com moderado consumo de álcool¹⁸³. Entretanto, podemos supor que esta diferença esteja mais relacionada à sensibilidade do questionário na dificuldade de discriminação entre as opções "muito fácil e fácil" do que relacionada ao elemento causal do desfecho em si.

5.1 A autocoleta e a detecção de HrHPV

A autocoleta para detecção de HrHPV já tem sido implementada em vários países como um recurso para aumentar a participação nos programas de rastreamento do carcinoma cervical uterino e, na tentativa de melhorar a aderência e os resultados¹⁸⁴. Nessa linha, a Holanda foi o primeiro país a oferecer a opção da autocoleta para detecção de HPV, com resultados muito promissores¹⁸⁵. Desta maneira, a aceitação da autocoleta pode promover de várias maneiras, a qualidade do rastreamento para HPV e auxiliar na identificação das mulheres sob risco para o câncer cervical.

Identificamos algumas limitações em nosso estudo, tais como participantes com perfil de atendimento hospitalar de média e alta complexidade, traduzindo-se em um pequeno número de participantes. Outros estudos, com mulheres da comunidade, serão necessários para que se tenha clareza se idade é, efetivamente, uma barreira para a inclusão da autocoleta na rotina da prevenção de lesões do colo uterino. Além disso, algumas mudanças nas instruções disponibilizadas poderão ser melhoradas no sentido de ampliar a aceitabilidade da autocoleta, principalmente entre a população mais jovem. Por outro lado, um fator importante e favorável para nosso estudo foi este ter sido realizado com mulheres que já haviam sido submetidas à coleta convencional com um profissional da saúde. Elas preferiram e aceitaram a autocoleta em comparação à coleta tradicional, o que reforça, ao nosso ver, a qualidade da autocoleta. Finalmente, nossos resultados sugerem que mulheres da população estudada são receptivas à autocoleta, ressaltando-se que, no entanto, como foram observadas diferenças na aceitabilidade entre grupos etários, cada grupo deveria receber instruções apropriadas para sua idade.

Estes resultados trazem boa perspectiva alternativa para o rastreamento do carcinoma de colo uterino em nosso país. Como um dos mais populosos países do

mundo e apresentando uma dimensão territorial continental, o Brasil foi responsável pela morte de 6000 mulheres, ocasionada por carcinoma de colo uterino no último ano⁷, sendo uma das principais causas de morte por câncer em mulheres adultas no Brasil e a quarta causa de morte entre as mulheres no mundo⁶.

A infecção persistente por HPV é condição necessária para desenvolvimento do carcinoma de colo uterino¹⁸⁶. Esta descoberta, há décadas após a introdução do teste de Papanicolaou para o rastreamento do carcinoma de colo uterino, oferece inúmeras e novas oportunidades para a prevenção primária e secundária, como imunização para prevenir a infecção pelo HrHPV e rastreamento baseado em tecnologia molecular, respectivamente.

Apesar do inequívoco sucesso dos programas de rastreamento citológico em reduzir fardo por carcinoma de colo uterino em países mais desenvolvidos¹⁸⁷, essa metodologia tem várias limitações, amplamente documentadas, quando comparadas às abordagens moleculares para detecção do HPV como base para as estratégias de prevenção secundária do câncer cervical. Há uma notória, e preocupante, baixa sensibilidade de um simples Papanicolaou em detectar lesões precursoras; em contrapartida, é reconhecido que a citologia apresenta alta especificidade. Essa dicotomia resulta em que um percentual significativo de mulheres com lesões cervicais serão classificadas erroneamente como negativas na citologia^{77,188}.

Desde a introdução da vacina em 2007, a Austrália foi um dos países pioneiros a oferecer gratuitamente a vacinação por HrHPV e, rapidamente, observou-se um significativo declínio das lesões induzidas pelo HPV, desde condilomas acuminados a lesões de alto grau¹⁸⁹. A diminuição das lesões precursoras do carcinoma de colo uterino tem sido descrita em várias populações vacinadas¹⁹⁰⁻¹⁹¹. Dada a natureza subjetiva da

citologia, a sensibilidade e especificidade podem não permanecer constantes na era pós-vacina, tendendo a piorar os valores de desempenho do método⁹³. A menor prevalência das anormalidades escamosas em coortes vacinadas podem trazer consequências negativas mais significativas ainda em relação à acuidade diagnóstica, resultando em declínios ainda maiores do VPP e na eficácia dos próprios programas de rastreamento^{192,93}. Embora um menor número de mulheres com amostras contendo anormalidades escamosas seja esperado, a prevalência de inflamação, atipias reativas, ASCUS e LSIL atribuídas a outros tipos de HPVs de baixo risco poderão ser mantidas, levando, desta forma, a uma relação sinal-ruído reduzida em discriminar verdadeiras lesões escamosas precursoras de outras condições benignas, fazendo com que a citologia não seja mais o teste de eleição adequado para rastreamento do carcinoma de colo uterino⁹³.

Existem vários ensaios comparando rastreamento com uso de DNA de HPV e/ou citologia. Estudos randomizados e controlados da América do Norte, demonstraram superior sensibilidade da detecção do DNA de HPV, sobre a citologia na detecção de lesões precursoras do colo uterino¹⁹³⁻¹⁹⁴. Outros estudos ratificaram o melhor desempenho do teste molecular, sugerindo que introdução do teste primário para HrHPV poderia levar a um mais acurado reconhecimento de casos de carcinomas de células escamosas, bem como dos casos de adenocarcinomas¹⁹⁵⁻¹⁹⁶. Embora a introdução da citologia tenha sido relacionada à diminuição da incidência e mortalidade por carcinoma de células escamosas em países desenvolvidos, com robusta e persistente organização dos programas de rastreamento, demonstrou menor efetividade em detectar e prevenir adenocarcinoma e suas lesões precursoras¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.

No presente estudo, as participantes vieram referenciadas para exame colposcópico por alteração citológica. Apenas um pequeno número foi DNA de HrHPV negativo em casos NIC 2+, sendo que o grupo PS apresentou cinco casos: um NIC 2, um AIS, um adenocarcinoma, um carcinoma de células escamosas e um adenocarcinoma associado a carcinoma de células escamosas. O grupo AC apresentou quatro casos com diagnóstico histopatológico de NIC 2. Os testes baseados na detecção do DNA de HPV apresentam alto VPN para detecção viral, embora, dependendo do método utilizado e da conservação e preparo das amostras, a não detecção do genoma viral possa ocorrer em 5 a 10% dos cânceres invasivos, 10 a 15% dos casos de HSIL e de 20 a 30% de LSIL¹⁹⁹. Resumidamente, os resultados falsos negativos podem ser decorrentes da sensibilidade do método utilizado, deleção ou rearranjo do gene do HPV a ser detectado ou amostra inadequada. Os verdadeiros negativos podem estar relacionados, ainda, devido a perda da sequência do gene viral²⁰⁰.

Mulheres vivendo em áreas rurais, imigrantes recentes em cidades metropolitanas, população indígena e mulheres de países em desenvolvimento ou de baixa renda têm menor probabilidade de serem rastreadas para os carcinomas, ou mesmo de manter o adequado seguimento, estando sob maior risco de desenvolver lesões graves²⁰¹⁻²⁰². Nas regiões Norte e Nordeste brasileiras, cerca de 27% da população vive em área rural. Abranger estas mulheres desassistidas pode ser conseguido pela introdução do rastreamento primário para detecção de HrHPV através do procedimento de autocoleta²⁰³. A acurácia dos testes para HPV em amostras feitas por AC ou coleta pelo PS tem mostrado que a sensibilidade e especificidade para detecção de lesões precursoras ou mesmo câncer foi menor na autocoleta¹⁷⁵. No entanto, alguns estudos ressaltaram o viés da acurácia de diferentes testes de detecção de DNA de HPV, sugerindo utilizar, para garantir a máxima segurança possível dos

resultados, o uso de testes aprovados por agências reguladoras como o FDA, por exemplo²⁰⁴. Há, também, uma reconhecida e substancial variação na acurácia clínica, em grande parte atribuída ao uso de diferentes escovas ou dispositivos para autocoleta²⁰⁵. Outra explicação para as variações é atribuída à maior carga viral advinda da endocérvice colhida pelo PS quando comparada com a realizada por AC²⁰⁶.

No presente estudo utilizamos, para detecção de DNA do HPV, a metodologia de PCR do teste COBAS® 4800 HPV (Roche), clinicamente validado e aprovado pelo FDA. O dispositivo de autocoleta *EvalynBrush®* (Rovers), utilizado em nosso estudo também tem sido amplamente utilizado em inúmeros trabalhos e validado internacionalmente²⁰⁷, o que nos garantiu altos padrões de qualidade em relação à coleta.

Verificamos uma significativa relação entre a infecção por HPV e diagnóstico anatomopatológico, avaliando a prevalência de HrHPV entre as participantes com NIC 2+, NIC 1 e NLP. O teste para detecção de HPV em amostras autocoletadas e amostras coletadas pelo PS apresentaram sensibilidade e especificidade similares para o diagnóstico de NIC 2+, ratificando o grande potencial das amostras obtidas por autocoleta no cenário clínico. Esse achado tem sido reportado em outros estudos; um deles enfaticamente sugere que autocoleta para detecção de HrHPV poderia ser utilizada como método de triagem primária em programas de rastreamento, para o cc²⁰⁵. Adicionalmente, a oferta de autocoleta para detecção de HrHPV aumentou significativamente a participação de mulheres que, rotineiramente, não se submetiam aos programas de rastreamento com exame citológico²⁰⁸.

As participantes mais jovens de nosso estudo referiram mais medo e desconforto no procedimento de autocoleta, sugerindo que atitudes educacionais adequadas devam ser importantes nas gerações mais jovens. O mais importante fator associado da adesão

à autocoleta, para testagem do HPV, foi a atitude e o conhecimento relacionados ao procedimento, o que reforça o importante papel da educação no aprimoramento das intervenções que visam a prevenção de carcinoma de colo uterino²⁰⁹. Encontramos, no entanto, boa aceitabilidade em todas as faixas etárias e imputamos, parcialmente, a esse resultado, a utilização de folheto ilustrativo para orientação da autocoleta e a presença do profissional da saúde durante a realização do procedimento, oferecendo suporte nas eventuais dificuldades.

A distribuição e prevalência dos genótipos de HPV varia de acordo com o grau da doença, idade e localização geográfica das pacientes²¹⁰. Encontramos o DNA do HrHPV em mais de 90% dos casos de NIC 2+, em concordância com a literatura, sem diferença significativa entre os grupos PS versus AC (sensibilidade: 93,7%, grupo PS; 94,1%, grupo AC; especificidade: 30,3%, grupo PS; 31,0%, grupo AC). No entanto, encontramos DNA do HrHPV em cerca de 90% dos NIC 1 (90,9%-PS; 90,9%-AC) de forma semelhante entre os grupos, bem acima do relatado pela literatura²¹¹. Entretanto, grande número de estudos na literatura são estudos de rastreamento populacional com grande número de participantes, diferentemente do presente estudo.

Vale ressaltar, ainda, que em nosso estudo os HPVs-outros tipos e HPV16 foram os HrHPV mais encontrados, em percentual semelhante em ambos os grupos e, também, os mais frequentemente identificados em associação com NIC 2+ (grupo PS: HPV-outros tipos em 43,9% e HPV 16 em 34,7%; grupo AC: HPV 16 em 37,7% e HPV-outros tipos em 36,0%). Esses dados são semelhantes ao estudo de rastreamento realizado pela Fundação Oncocentro de São Paulo, que encontrou os HPVs 35, 39, 68, 56, 59 e 66 como os mais frequentes genótipos, seguidamente pelos HPVs 16 e 52²¹². Ainda, ilustrando a variabilidade geográfica, no Brasil, os HPVs 31 e 33 foram os

segundos tipos mais prevalentes nas regiões Nordeste e Centro-Oeste²¹³; para outros estudos brasileiros, o percentual mais elevado foi do HPV 56²¹⁰.

As diretrizes atuais dos EUA recomendam a genotipagem apenas para HPV16 e HPV18, sendo que a detecção de qualquer um deles é suficiente para o encaminhamento da mulher para colposcopia¹¹⁰. Por outro lado, alguns estudos sugerem que outros tipos como HPVs 31, 33, 33/58 apresentam risco comparável ou até mesmo aumentado para desenvolvimento de NIC 2+, em concordância com os nossos achados²¹⁴.

Tais achados podem auxiliar no direcionamento de condutas em relação à prevenção primária ao HPV. As duas vacinas licenciadas, bivalente e quadrivalente, proveem proteção contra os HPV 16, 18 e 16, 18, 6 e 11, respectivamente, por mais de 10 anos²¹⁵. A nova vacina, nonavalente, que inclui proteção contra alguns HPVs das espécies Alfa-9, HPVs 16, 31, 33, 52 e 58 e Alfa 7, HPVs 18, e 45, além dos HPVs 6 e 11 já foi aprovada para uso em alguns países, oferecendo proteção contra cerca de 90% dos tipos de HPV relacionados ao desenvolvimento do carcinoma de colo uterino²¹⁶. Contudo, a erradicação do carcinomas de colo uterino só será possível com altas taxas de vacinação efetiva em meninas, em todas as regiões, países no mundo²¹⁷. Uma recente revisão de vacinação global para HPV identificou que somente 32,1% das adolescentes, entre 10 e 20 anos em países de alta renda e aproximadamente 0,3% nos países de média e baixa renda tiveram vacinação completa²¹⁷.

Por motivos já citados, vários países estão direcionando seus recursos para substituição do rastreamento citológico pelo molecular. No entanto, muitos destes países sugerem o rastreamento primário com teste para detecção de HrHPV, e a citologia, por sua maior especificidade, aplicada nas amostras com DNA de HPV positivas. Neste sentido, a LBC, além de apresentar a evolução técnica da citologia convencional, oferece

um único meio de coleta que preserva os ácidos nucleicos para realização do teste para detecção do DNA do HPV e outros testes⁸⁷.

O nosso estudo foi desenhado de forma sistematizada e pareada com dois grupos distintos. Uma alternativa seria colher duas amostras da mesma participante (AC e PS), no mesmo dia, mas um viés negativo na precisão da segunda amostra não poderia ser descartado, pois a amostra cervical, habitualmente, pode causar pequenos danos ao tecido cervical e consequente sangramento, além da diminuição celular que poderia ocorrer na segunda coleta²⁰⁵. Os grupos apresentaram-se de maneira homogênea, tanto em relação às características quantitativas quanto às características qualitativas, exceto em relação ao item “consumo de álcool”. Acreditamos que esta diferença tenha estado mais relacionada às características do questionário, com diferença tênue nas questões “ingesta de forma social” e “não consome”. Além disso, o percentual é grande em ambos os grupos na resposta “não consome”. Não nos parece de todo relevante essa questão para o desfecho encontrado no nosso estudo.

A média no número de parceiros sexuais, no grupo AC também foi superior ao grupo PS. Consideramos que a presença desta variável heterogênea deveu-se ao modelo transversal de estudo, sem, no entanto, interferir nas análises finais.

5.2 Desempenho citológico

Na citologia em base líquida observou-se forte associação significativa para as categorias AGM citológica e NIC 2+ para ambos os grupos. No grupo AC, entretanto, a associação foi fraca quando comparada com o grupo PS em que um percentual grande

de participantes com NIC 2+ no anatomopatológico apresentaram citologia NILM. Uma provável explicação seria devido à possível menor quantidade, ou mesmo à ausência, de células da junção escamocolunar, num percentual das participantes do grupo AC, devido ao direcionamento topográfico, menos focal da escova de autocoleta à JEC (às cegas) com menor descamação de células desta região. No entanto, para efetiva conclusão, seria necessário maior número de participantes em NILM.

Em estudos com grande número de mulheres com mais de 25 anos, que se submeteram ao rastreamento primário para detecção de HPV, registrou-se aumento significativo no número de NIC 3 detectadas, comparativamente ao rastreamento com citologia oncológica, mas com indicação de maior número de colposcopias^{109, 218}.

O teste do DNA do HPV não prevê quais infecções irão progredir para carcinoma, o que requer métodos adicionais para selecionar mulheres positivas para HrHPV para a colposcopia^{113,122}. Para este fim, vários testes têm sido estudados, incluindo a genotipagem por HPV (HPV 16 ou HPV 18 ou HPV 16/18). Considerando-se o benefício de detectar maior número de lesões precursoras do carcinoma associado à essa estratégia, é importante considerar os prejuízos que podem estar associados a grande número de colposcopias e procedimentos associados, particularmente em mulheres mais jovens, abaixo dos 30 anos, que tem alta prevalência de NIC 2, que, embora severas, são lesões que por vezes são susceptíveis de regressão espontânea²¹⁹⁻²²⁰.

Atualmente, os métodos mais promissores vão além da identificação de HPVs e incluem majoritariamente metilação dos genes do hospedeiro e dos vírus, detecção de proteína E6 do HPV²²¹⁻²²² e métodos citológicos que identifiquem células em proliferação¹¹³. Todas essas abordagens são mais específicas que o teste do HrHPV

para detecção de lesões precursoras de carcinoma e, assim sendo, têm sido consideradas para triagem colposcópica em mulheres HrHPV positivas.

5.3 Dupla-coloração por p16/Ki-67

A infecção persistente pelo HrHPV pode induzir mudanças na célula infectada, resultando na expressão concomitante da proteína supressora de tumor p16 e o marcador de proliferação Ki-67, o que não ocorre em ciclos celulares normais¹¹³. Enquanto a expressão de p16, isoladamente, ainda requer avaliação morfológica para ser associada à alteração celular pré-neoplásica, pode-se reduzir o padrão de complexidade ao permitir que se foque em um pequeno grupo de células coradas por p16. Por outro lado, para a dupla-coloração de p16 e Ki-67, o critério de positividade é reduzido a uma única célula com núcleo e citoplasma corados. A acurácia longitudinal do p16 (sem Ki-67) como uma triagem de mulheres HrHPV positivas foi estudada em mulheres com idade entre 35 e 60 anos. O risco de desenvolvimento de NIC 3+ em três anos foi seis vezes maior em mulheres HPV+/p16+ comparado com mulheres HPV+/p16- (4,7% e 0,8%, respectivamente), sendo que a grande maioria das mulheres que tiveram NIC 3+ no seguimento eram p16+ inicialmente. Os autores concluíram que mulheres HrHPV+/p16+ deveriam ser imediatamente referenciadas para colposcopia, enquanto mulheres HPV+/p16- poderiam aguardar ao menos dois anos¹¹⁷.

Adicionalmente, vários outros estudos descreveram dupla-coloração por p16/Ki-67 como uma valiosa opção metodológica para triagem colposcópica em mulheres HrHPV+, indicando que a dupla-coloração dessas proteínas pode aumentar a sensibilidade da citologia^{110,223-224,121-122}. O estudo com maior número de participantes demonstrou que para detecção de NIC 3+, a sensibilidade de dupla-coloração citológica

versus citologia oncológica isoladamente (Pap) era significativamente maior (75% *versus* 52%), assim como VPN e VPP, e com especificidade equivalente²²⁴.

No presente estudo, o biomarcador p16/Ki-67 apresentou maiores índices de positividade em participantes com NIC 2+, tanto no grupo PS, quanto no grupo AC (84,4% *versus* 93%); e maiores índices de negatividade em NPL e NIC 1 em ambos os grupos PS e AC, respectivamente (NLP:51,9% e NIC 1:7,4% *versus* NLP: 32,6% e NIC 1: 19,6%), sendo esta associação mais nítida no grupo PS que no grupo AC.

Considerando-se a sensibilidade da dupla imunocoloração citológica, p16/Ki-67 em predizer NIC 2+, nossos resultados assemelharam-se aos estudos holandês¹²² e norueguês²²³ e também ao estudo de Wentzensen e colaboradores¹¹⁰ (grupo PS: 85,52%; grupo AC: 70,67%). Ainda, um estudo espanhol descreveu sensibilidade e VPN mais altos que os anteriores (98,04%); entretanto, com especificidade mais baixa (39,1%) e de valor percentual semelhante ao estudo holandês (31,0%)²²⁵. Nosso estudo demonstrou especificidade (grupo PS: 59,26%; grupo AC: 85,71%) com percentual semelhante à publicação holandesa e de Wentzensen e colaboradores, e maior que dos estudos espanhol e norueguês.

A alta sensibilidade não chega a ser surpreendente, pois a expressão de ambos os marcadores, simultaneamente, representa um sinal específico de transformação neoplásica¹²². Adicionalmente, recente publicação escocesa demonstrou maior sensibilidade, mas menor especificidade do p16/Ki-67 comparadas com a citologia oncológica convencional²²⁶. A sensibilidade variável em séries publicadas se deve a prováveis diferenças técnicas, causadas principalmente pela menor ou mesmo insuficiente celularidade¹¹⁰. Resultados variáveis, tais como mais baixa especificidade,

entre os diferentes estudos podem ser consequentes, também, às diferenças no tipo de população rastreada, tamanho da amostra e duração do acompanhamento.

Uma importante vantagem de dupla coloração p16/Ki-67 é que ela não inclui avaliação morfológica das células positivas, simplificando a interpretação e diminuindo a variabilidade entre os observadores, melhorando a reprodutibilidade²²⁷. Contudo, mesmo essa qualidade pode estar sujeita a críticas se não houver cuidado na avaliação dos achados imunocitoquímicos. Nesse sentido, foram demonstradas diferenças importantes na reprodutibilidade entre observadores, de acordo com experiência, salientando a necessidade de treinamento robusto e segurança de qualidade²²⁸.

5.4 Superóxido dismutase de manganês - SOD2

A proteína superóxido dismutase de manganês SOD2, outro biomarcador que foi avaliado neste estudo, está diretamente envolvida na regulação do estresse celular. No entanto, as funções exatas de SOD2 em processos neoplásicos não são completamente compreendidas. Esse é o motivo pelo interesse na sua avaliação em nossa série. Teoricamente, a redução do estresse oxidativo modulado pela expressão de SOD2 poderia evitar lesões no DNA e, consequentemente, sua expressão teria um efeito protetor no processo de carcinogênese. Contudo, o aumento da expressão de SOD2 em células neoplásicas as protegeria de vias de morte celular programadas, ativadas pelas ROS. Paradoxalmente, a redução de expressão de SOD2 pode levar ao acúmulo destas espécies, favorecendo a seleção de células que acumulam danos no seu DNA²²⁹.

A avaliação dos níveis de proteína SOD2 por imunoistoquímica, em amostras de carcinomas demonstrou que a positividade da coloração por SOD2 aumentava em paralelo com o aumento da gravidade da alteração escamosa cervical (40% de positividade para carcinoma de células escamosas), sendo particularmente maior em adenocarcinomas (66% de positividade)¹²⁵. Adicionalmente, o gene SOD2 integra um grupo de 11 genes identificados como genes de risco na predição de metástase para linfonodos pélvicos no carcinoma invasivo²³⁰.

No nosso estudo a expressão do biomarcador SOD2 foi maior entre as participantes do grupo PS em comparação com o grupo AC. Diferença significativa foi observada entre o estrato NLP e NIC 2+ em concordância com o estudo de Termini e colaboradores¹²⁵. Outro estudo, também, demonstrou que a expressão de SOD2 estava aumentada em NIC 3 e que 64% dos casos de carcinomas de células escamosas e 88% dos adenocarcinomas, revelaram forte expressão de SOD2²³¹. Na nossa série, observamos forte expressão de SOD2 em 54% dos casos de carcinomas de células escamosas. Na maioria das amostras de lesões de baixo grau ou amostras normais observou-se ausência ou baixa expressão de SOD2 à semelhança dos achados de Rabelo-Santos e colaboradores; este padrão de expressão de SOD2 foi estatisticamente independente da presença de HPV 16 e/ou HPV 18²³¹. No entanto, tivemos uma participante com adenocarcinoma, cujo caso foi citologicamente inconcludente para avaliação do SOD2, e outra, com diagnóstico de adenocarcinoma associado a carcinoma de células escamosas, cuja expressão de SOD2 foi negativa. Particularmente, no grupo AC, uma participante apresentou diagnóstico citológico inicial de adenocarcinoma invasivo de colo uterino, mas teve como diagnóstico anatomopatológico final, resultado de adenocarcinoma endometrial infiltrativo. De maneira especial, esta participante apresentou forte expressão de SOD2 no material citológico da autocoleta.

5.5 O microambiente tumoral

O entendimento atual converge para o consenso de que as células neoplásicas exibem uma gama de fenótipos metabólicos diferenciados, num microambiente específico, que acumulam ROS excessivamente em relação às células normais²²⁹. Evidências recentes sugerem a importância das interações entre hospedeiro, imunidade inata, microbioma e viroma no trato genital. *Lactobacillus* produzem peróxido de hidrogênio, preservando um ambiente protetivo na vagina, com pH baixo. *L. crispatus* produz mais ácido láctico comparado com *L. iners*. Estudos, consistentemente, demonstraram baixas taxas de *L. crispatus* (CST I) em mulheres com doença cervical e maiores taxas de *L. iners* ou disbiose²³²⁻²³³. *L. iners* tem sido implicado na depleção de glutathiona reduzida, diferentemente de *L. crispatus* e *L. jensenii*, que têm sido associados a níveis aumentados desta substância²³⁴, indicando que a colonização por *L. iners* resulta em níveis maiores de estresse oxidativo. Este, associado à vaginose bacteriana, pode resultar na formação de ROS que então favorece o rompimento do DNA de dupla fita no genoma do hospedeiro, facilitando a integração do HPV e, por fim, a transformação neoplásica, mecanismo também utilizado pela oncoproteína E6²³⁵.

No presente estudo, em dados coletados do laudo da colpocitologia oncológica, não se observou em ambos os grupos, PS e AC, a presença de flora vaginal específica nas participantes NIC 2+ comparativamente às participantes com grau menor de lesão cervical. Da mesma forma, não se observou predominância de flora vaginal específica, com significância estatística, em ambos os grupos, PS e AC, seja em mulheres HPV positivas ou HPV negativas. No entanto, observou-se um percentual maior de

Gardnerella vaginalis no grupo AC em relação ao grupo PS com diferença estatisticamente significativa. A taxa de CST IV (e de certo modo CST III, com predominância de *L. iners*) não era diferente em mulheres HPV negativas ou HPV positivas/LSIL, mas substancialmente maior para mulheres com HSIL, sugerindo que a presença de microbioma depletado de diversidade de *Lactobacillus* pode estar mais relacionado à presença de doença pré-invasiva ou mesmo invasiva do que à presença do vírus por si só^{232, 236}.

A maior detecção de *Gardnerella vaginalis* pode ser justificada pelo fato da coleta pelo PS ser direcionada à ecto e endocérvice e, na autocoleta, o movimento realizado com a escova apresentar maior amplitude, abrangendo paredes vaginais e fundos de saco anterior e posterior, refletindo, de certa forma, a flora cervical e vaginal. Estudos futuros, avaliando o impacto do microbioma vaginal na carcinogênese cervical poderão explorar o elo causal, em amostras longitudinais, que permitirão correlacionar o microbioma ao desfecho clínico e, em particular, a progressão ou regressão da infecção pelo HPV e doença cervical.

5.6 Expressão da α -manosidase

Com a necessidade de desenvolver novas estratégias para detecção de lesões precursoras ou mesmo neoplásicas, estudou-se outra proteína, a α -manosidase. Utilizando o método de apresentação de fagos peptídeos (*phage display*), identificou-se sequências peptídicas com afinidade preferencial para linhagens celulares e tumores do colo do útero. Uma das sequências correspondeu à α -manosidase²³⁷. Observou-se que os tecidos cervicais expressavam esta proteína, e que a expressão era maior em lesões de alto grau e câncer, em comparação com a mucosa normal. Tumores associados ao

HPV recrutam várias populações de leucócitos que parecem contribuir para a progressão de lesão e crescimento do tumor^{33, 238}. A atividade da α -manosidase no câncer pode ter seu efeito através da migração e invasão das glicoproteínas, bem como através das células do microambiente tumoral como macrófagos e células NK. Em nossa série não houve diferença em relação à expressão de α -manosidase nos grupos PS e AC, nas participantes NLP; nos estratos NIC 1 e NIC 2+ observou-se aumento, com significância estatística, entre as participantes NLP e NIC 2+, apenas no grupo AC. No entanto, observou-se, como no descrito por Lepique e colaboradores anteriormente, correlação positiva com a gravidade da lesão²³⁷.

5.7 Painel de biomarcadores

Um escore final foi proposto com o objetivo de combinar pontos de maior qualidade diagnóstica entre os biomarcadores SOD2, α -manosidase e p16/Ki-67. Com recurso matemático, utilizou-se “mais três” para todas as participantes positivas para p16/Ki-67 ou “menos três” para as negativas, conforme descrito previamente. As coordenadas da curva ROC construída foram avaliadas com finalidade da escolha do melhor ponto de corte (*cutoff*) para os escores de α -manosidase e SOD2, devido à necessidade de padronização desses eventos, por ser, até onde sabemos, a primeira vez da realização e avaliação destes marcadores em citologia. Não encontramos na literatura qualquer registro de estudo semelhante. Ambos os indicadores pareceram ter menor acurácia no grupo PS do que no grupo AC, sem diferença significativa entretanto, e com escore final aproximando-se de 80% (grupo PS:0,782; grupo AC:0,812). Portanto, tanto α -manosidase quanto SOD2 parecem ter bom desempenho discriminatório; no

entanto, a combinação dos dois biomarcadores juntos à positividade de p16/Ki-67, apresenta melhor resultado, com elevada acurácia na predição de NIC 2+.

O que chamou atenção nas análises (*cutoff* =1,0) foi o desempenho da dupla-coloração p16/Ki-67, que se mostrou superior em sensibilidade em relação à α -manosidase e SOD2 (78,10%; 45,81%; 44,51%, respectivamente) e equivalente em especificidade (71,43%; 77,78%; 71,19%, respectivamente). Na análise final (*cutoff* =1,5), a acurácia aumentou para 77,78%, quando a anterior era de 76,33%. No entanto, não se observou diferença estatística significativa entre os dois grupos.

5.8 Considerações finais

É importante ressaltar que para a confecção das três lâminas para a realização imunocitoquímica dos biomarcadores, utilizou-se material celular oriundo do mesmo recipiente, contendo dez mililitros de líquido de preservação celular, e de onde foi extraído, inicialmente, material celular para realização de citologia corado pela técnica de Papanicolaou. Este fato pode ter contribuído para menor sensibilidade dos biomarcadores no nosso estudo em relação à maioria dos estudos, não baseados em protocolos com amostra dividida.

Além das análises apresentadas, verificou-se associação estatisticamente significativa entre os grupos PS e AC na quantidade de lâminas inadequadas para leitura. Observou-se, na análise da α -manosidase e SOD2, 11 casos inadequados no grupo PS *versus* três casos inadequados no grupo AC e 11 casos inadequados no grupo PS *versus* dois no grupo AC, respectivamente. Entretanto, tal associação não ocorreu em relação

ao p16/Ki-67, onde contabilizou-se seis casos inadequados, no grupo PS *versus* 11 casos inadequados no grupo AC, sem diferença significativa. Tal achado pode encontrar justificativa no movimento mais amplo, menos focal, da escova de autocoleta, que pode abranger paredes vaginais e fundo de saco anterior e posterior, trazendo uma maior quantidade de células. A grande maioria das lesões cervicais uterinas são de origem escamosa, não desfavorecendo, nesta situação, a autocoleta. No entanto, na AC uma quantidade maior de *debris* celulares oriundos, essencialmente, de fundo de saco posterior e provável menor quantidade de células da JEC podem ter dificultado a leitura do citologista, nas situações onde a avaliação morfológica celular deve ser considerada. Entretanto, na observação do resultado final destes biomarcadores, considerando-se pontos favoráveis e desfavoráveis da AC *versus* coleta pelo PS, observou-se resultados semelhantes.

Outra observação de destaque foi relacionada a um dos quesitos do questionário clínico e sociodemográfico que relacionou-se à prática sexual anal com frequência ou em algum momento da vida. No presente estudo, observou-se que é prática bastante frequente, com maioria das mulheres em ambos os grupos, tendo referido resposta positiva. Tem-se reconhecido que certos grupos têm riscos substancialmente maiores de câncer anal do que a população geral. Em estudo tipo coorte, HPV, principalmente HPV 16, foi encontrado em 88% de pacientes com câncer anal²³⁹, assim como em biópsias de neoplasia intraepitelial anal²⁴⁰⁻²⁴². Outros fatores de risco identificados para câncer anal incluem tabagismo²⁴³, transplante de órgãos sólidos²⁴⁴ e mulheres HIV positivas, mesmo com CD4 normal²⁴⁵. Estes dados são de grande importância devido ao grande número de mulheres imunossuprimidas, seja por transplante ou por uso de medicamentos imunossupressores, atendidas no ambulatório de PTGI. Há forte evidência epidemiológica, demonstrando risco de cerca de três vezes maior de câncer

anal em mulheres com história prévia de câncer *in situ* ou invasivo do colo, vagina e vulva, comparando-se com população geral²⁴⁶⁻²⁴⁷. Estudo canadense demonstrou que rastreamento para câncer anal não tem, provavelmente, boa relação custo-efetividade para indicar-se estratégias de rastreamento na população geral, mas deve ser considerado em mulheres com lesão de alto grau ou câncer cervical uterino²⁴⁸.

Diferentemente dos fatores limitantes descritos anteriormente, nosso estudo apresentou um ponto forte, que foi a coleta de biópsias cervicais e o padrão-ouro estabelecido nos espécimes de tecido biopsiado.

Por fim, a implementação da triagem primária para detecção de HrHPV oferece vantagens, devido ao desempenho aprimorado do diagnóstico da mulher sob risco do câncer do colo uterino. Atualmente, não existe uma abordagem única que ofereça uma solução binária de encaminhamento para a colposcopia nas mulheres HrHPV positivas. Os biomarcadores estudados podem ser uma opção viável, devido ao bom desempenho destes, salientando-se a dupla-coloração, ou mesmo a associação dos três biomarcadores, conjugando-se sensibilidade e especificidade. A mudança no paradigma de triagem para o câncer cervical poderá favorecer a capacitação das mulheres, dando-lhes a opção da autocoleta como método a ser incluído nos programas de triagem.

6 Conclusões

1. Autocoleta vaginal tem boa aceitabilidade nas mulheres referenciadas para exame colposcópico em hospitais universitários de atendimento secundário e terciário à saúde;
2. A citologia em base líquida possui forte associação nas categorias “alto grau de malignidade” citológica e NIC 2+ para os grupos estudados (PS e AC). Associação fraca foi observada entre as categorias “negativo para lesão intraepitelial ou malignidade” citológica e NIC 2+, com menor desempenho no grupo AC em comparação ao grupo PS;
3. A detecção de HrHPV em amostras do grupos PS e AC são semelhantes em relação a sensibilidade e a especificidade para detecção de NIC 2+, não havendo inferioridade do desempenho para detecção de HrHPV do grupo AC em relação ao grupo PS;
4. O biomarcador p16/Ki-67 tem bom desempenho, com os maiores índices de positividade em NIC 2+ e maiores índices de negatividade em NLP e NIC 1 em ambos os grupos;
5. Os biomarcadores SOD2 e α -manosidase têm expressão crescente conforme gravidade de lesão cervical. A expressão do SOD2 foi maior no grupo PS do que no grupo AC; a expressão da α -manosidase, contrariamente, apresentou-se maior no grupo AC. A combinação dos biomarcadores apresenta boa acurácia na predição de NIC 2+ em ambos os grupos.

7 Anexos

Anexo A – Aprovação do Projeto de Pesquisa - Hospital Universitário

São Paulo, 28 de abril de 2016.

Ilmo(a). Sr(a).

Dr. José Maria Soares Junior

Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Eficácia da auto-coleta cervicovaginal no rastreamento do câncer do colo do útero"

Pesquisador(a) responsável: Dr. José Maria Soares Junior

Equipe de Pesquisa: Noely Paula Cristina Lorenzi, Edmund Chada Baracat, Kátia Candido Carvalho, Lana Maria de Aguiar, Isabel Cristina Esposito Sorpreso

CAAE: 38719314.2.3001.0076

Registro CEP-HU/USP: 1542/16

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 15 de abril de 2016 analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra "d".

O primeiro relatório está previsto para 15 de outubro de 2016.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

17. / 10. / 16

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tel.: (11) 3091-9457 – E-mail: cep@hu.usp.br

Anexo B – Aprovação do Projeto de Pesquisa - HCFMUSP

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: "EFICÁCIA DA AUTO-COLETA CERVICOVAGINAL NO RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO"

Pesquisador Responsável: José Maria Soares Junior

Versão: 1

Pesquisador Executante: Noely Paula Cristina Lorenzi

CAAE: 38719314.2.0000.0068

Co-autores: Edmund Chada Baracat; Isabel Cristina Espósito Sorpreso; Lana Maria de Aguiar; Katia C. Carvalho

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Orientador: José Maria Soares Junior

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12918

Número do Parecer: 897.166

Data da Relatoria: 03/12/2014

Apresentação do Projeto: O protocolo em questão apresenta relevância científica e trará benefícios para área da saúde e não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo do estudo é avaliar os resultados da auto-coleta vaginal no rastreamento do câncer do colo do útero. Os objetivos estão claros e pertinentes à proposta dos pesquisadores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco do sujeito da pesquisa é baixo, pois trata-se de um exame da rotina ginecológica para suspeita de câncer de útero e ainda a adição de um grupo com auto-coleta que será alvo do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto apresenta grande relevância na área médica e trará benefícios ao sujeito da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos estão adequados e informam o sujeito da pesquisa de forma clara.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não apresenta pendências

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 03 de Dezembro de 2014

Prof. Dr. Alfredo José Mansur

Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

14/09/2015 9:38 PM

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Eficácia da auto-coleta cervicovaginal no rastreamento no câncer do colo do útero.

PESQUISADOR : Noely Paula Cristina Lorenzi

CARGO/FUNÇÃO: Médica Ginecologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 57457-SP

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de ginecologia e obstetrícia – Disciplina de ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

O objetivo deste estudo é avaliar a sensibilidade da coleta, realizada por você mesma, de material da vagina e do colo do útero no rastreamento do câncer do colo.

Será utilizada uma escova denominada Evalyn. Ela é feita de material estéril, com fibras delicadas, que foi desenvolvida para ser usada pela própria mulher. Após introdução e retirada da escova da vagina, amostras de células são obtidas e são submetidas a avaliação, como no teste de Papanicolaou. Neste mesmo material, faz-se a pesquisa do vírus chamado HPV.

Esta coleta não dói e não causa problemas. Você poderá sentir um pouco de cólica, como discreta cólica de menstruação no momento da coleta.

A seguir você fará um exame chamado colposcopia ou vulvoscopia, que será realizado pelo médico.

Este é um procedimento comum que faz parte dos exames de rotina preventivos do aparelho genital feminino, quando de alterações no exame de Papanicolaou ou presença de alterações na vulva.

Através da utilização de um aparelho de amplificação, semelhante a um microscópio, denominado colposcópico, observa-se o colo, vagina, vulva e, quando da presença de alterações, retira-se pequeno fragmento desta(s) área(s) (biópsia). A biópsia é feita com auxílio de pequena pinça, sem necessidade de anestesia (colo e vagina). Na vulva há necessidade de pequena quantidade de anestesia, administrada com agulha delicada que causa pouca dor. Não é necessário dar pontos após esta biópsia.

Após a biópsia, coloca-se pequeno tampão vaginal que deverá ser removido, por você, cerca de 3 horas após o procedimento. Raramente poderá haver pequeno sangramento vaginal no mesmo dia ou no dia seguinte.

Após a biópsia, você não deverá ter relação sexual, nem realizar ducha vaginal por 3 dias.

Trata-se de estudo experimental testando um novo modelo de rastreamento para o câncer do colo do útero.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Noely Paula Cristina Lorenzi que pode ser encontrada no ambulatório de ginecologia do Hospital das Clínicas, no quinto andar, bloco 1. Telefone(s) 2661-6000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CapPesq – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-7585 – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br ou CEP-HU/USP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – CEP: 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone: (11) 3091-9457 – e-mail: cep@hu.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

A participante poderá ser atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Há compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Eficácia da auto coleta cervicovaginal no rastreamento do câncer do colo do útero.

Eu discuti com a Dra. Noely Paula Cristina Lorenzi. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do participante /representante legal Data ____/____/

Assinatura da testemunha Data ____/____/

para casos de participantes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/

Anexo D – Ficha dados clínicos e sociodemográficos - PTGI (frente)

FICHA PTGI			
NOME _____			
COR _____	IDADE _____	RH/HU ou SUS _____	
GRAU DE INSTRUÇÃO ☐ Não escolarizado ☐ 1º Grau Completo ☐ 2º Grau Completo ☐ Superior Completo ☐ Mestrado ☐ Doutorado			
1. Antecedentes Pessoais			
TRATA DE ALGUMA DOENÇA? ☐ Não ☐ Sim Qual? _____			
FAZ USO DE ALGUM MEDICAMENTO CRONICAMENTE? ☐ Não ☐ Sim Qual? _____			
JÁ FOI OPERADA ALGUMA VEZ? ☐ Não ☐ Sim Que cirurgia? _____			
TEM ALERGIA A ALGUM MEDICAMENTO? ☐ Não ☐ Sim Qual? _____			
TEM ALERGIA A ALGUMA SUBSTÂNCIA? ☐ Não ☐ Sim Qual? _____			
FUMA? ☐ Não ☐ Sim, menos de 10 cigarros/dia ☐ Sim, mais de 10 cigarros /dia ☐ Sim, mais de 20 cigarros/dia			
FAZ USO DE BEBIDA ALCOÓLICA? ☐ Não ☐ Sim, socialmente ☐ Sim, diariamente ☐ Sim, todo fim de semana Que tipo de bebida e quanto? _____			
FAZ USO DE DROGA? ☐ Não ☐ Sim, maconha ☐ Sim, cocaína ☐ Sim, crack ☐ Outras: _____ Quanto: _____			
FAZ ATIVIDADE FÍSICA? ☐ Não ☐ Sim _____ vezes/semana Qual: _____			
VACINAS ☐ Antitetânica ☐ Rubéola ☐ Hepatite A ☐ Hepatite B ☐ HPV			
2. Antecedentes Obstétricos			
QUANTAS VEZES ENGRAVIDOU? Parto Normal _____ Parto Cesárea _____ Abortos Espontâneos _____ Interrupções Voluntárias _____			
SUA IDADE NA PRIMEIRA GESTAÇÃO? _____ anos SUA IDADE NA ÚLTIMA GESTAÇÃO? _____ anos			
3. Antecedentes Menstruais e Contracepção			
SUA IDADE NA PRIMEIRA MENSTRUÇÃO? _____ anos DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO? ____/____/____ CICLO MENSTRUAL ☐ Regular ☐ Irregular			
MÉTODO ANTICONCEPCIONAL UTILIZADO: ☐ Camisinha: _____ sempre _____ eventualmente ☐ Camisinha Feminina ☐ DIU ☐ Injeção Trimestral ☐ Adesivo ☐ Laqueadura ☐ Diafragma ☐ Pílula ☐ Tabela ☐ Vasectomia ☐ Mirena ☐ Espermicida ☐ Injeção Mensal ☐ Anel Vaginal ☐ Outros: _____			
4. Antecedentes Sexuais			
IDADE DA PRIMEIRA RELAÇÃO? _____ anos NÚMERO DE PARCEIROS ATÉ O MOMENTO? _____			
JÁ TEVE ALGUMA DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL? ☐ Não ☐ Sim Qual? _____			
JÁ TEVE OU TEM RELAÇÃO SEXUAL: ☐ Oral ☐ Anal USOU CAMISINHA? ☐ Não ☐ Sim Onde? _____			
VERRUGA GENITAL? ☐ Não ☐ Sim VERRUGA OU LESÃO EM OUTRA PARTE DOS CORPO? ☐ Não ☐ Sim			
O(S) SEU(S) PARCEIRO(S) SEXUAL(IS) TEM ALGUMA DOENÇA (DST)? ☐ NÃO ☐ Sim Qual? _____			
5. Antecedentes Familiares			
ALGUÉM DA SUA FAMÍLIA (PARENTESCO DE PRIMEIRO GRAU) TEM OU TEVE: ☐ Câncer ☐ Reumatismo ☐ Diabetes ☐ Trombose ☐ Depressão ☐ Doença Neurológica ☐ Doença Cardiovascular ☐ Doenças Respiratórias ☐ Outras: _____			
6. Exames Laboratoriais			
☐ Hepatite A ☐ Hepatite B ☐ Hepatite C ☐ Sífilis ☐ HIV ☐ Clamídia ☐ Sorologia para Herpes ☐ Outros: _____			
7. Indicação			

Anexo D – Ficha dados clínicos e sociodemográficos – PTGI (verso)

Exame colposcópico – HU-USP

VULVA			
Normal	Tumor
Atrófica	Cisto		
Lesão Hiperpigmentar	Infecção Secundária		
Leucoplasia	Outros		
Epitélio Aceto Branco	DST		
Ulceração	Teste de Collins + - - NR		
COLO E VAGINA			
Achados Normais		Achados Anormais	
Epitélio Escamoso Original: ___ Maduro ___ Atrófico		Dentro da ZT	
Epitélio Colunar – Ectopia: ___ LA ___ LP		Fora da ZT	
Zona de Transformação: ___ 1 ___ 2 ___ 3		Epitélio Aceto Branco ___ Plano ___ Denso	
Achados Insatisfatórios		Mosaico ___ Fino ___ Grosso	
JEC não visível		Pontilhado ___ Fino ___ Grosso	
Cérvice não visível		Iodo Parcialmente ___ Positivo ___ Negativo	
Inflamação severa		Vasos Atípicos	
Atrofia intensa		Orifícios Glandulares Espessados	
Trauma		Aceto Branqueamento Rápido	
Miscelânea		Teste de Schiller: ___ + ___ = ___	
Condiloma		Alterações Colposcópicas Sugestivas de Câncer Invasivo	
Queratose			
Outros			
LOCAL DA BIÓPSIA			
Colo			
LA ___ HS			
LP ___ HS			
Canal			
Vulva			
Clitóris			
LE			
LD			
Fúrcula			
Vagina			
PA			
PP			
PLD			
PLE			
OUTROS PROCEDIMENTOS			
CTG Canal	Polipectomia	Cauterização	Outros
CONDUTA E SEGUIMENTO			
EZT	Leep	Cone frio	Outros
RESULTADOS			Carimbo / Data

Anexo E – Folheto ilustrativo

1. Após lavar as mãos, pegue a escova e coloque-se em posição confortável.

2. Afaste os lábios vaginais com uma mão e, com a outra, insira o tubo coletor na vagina até as abas tocarem nos lábios da vagina.

3. Com uma mão segure no tubo transparente, e com a outra, empurre o êmbolo cor-de-rosa para dentro da vagina. Quando a escova estiver na posição correta, você ouvirá um “click” .

4. Gire o êmbolo cor-de-rosa 5 vezes na mesma direção. A cada volta você ouvirá um “click” e poderá contar as voltas. Retire o tubo com cuidado e puxe o êmbolo rosa até a escova desaparecer no tubo.

Anexo F - Questionário de aceitabilidade de Procedimento de Auto Coleta Vaginal

1. Em relação a orientação (entendimento) do uso da escova de auto coleta, você achou:

- ☐ muito fácil
- ☐ fácil
- ☐ um pouco difícil
- ☐ difícil

2. Em relação ao uso da escova de auto coleta, você achou:

- ☐ muito fácil
- ☐ fácil
- ☐ um pouco difícil
- ☐ difícil

3. Em relação ao desconforto ou dor no uso da escova de auto coleta, você achou:

- ☐ muito doloroso ou desconfortável
- ☐ doloroso ou desconfortável
- ☐ pouco doloroso ou desconfortável
- ☐ não é doloroso ou desconfortável

4. Em relação a sentir-se embaraçada ou envergonhada na coleta com uso da escova de auto coleta, você sentiu-se:

- ☐ muito embaraçada
- ☐ embaraçada
- ☐ pouco embaraçada
- ☐ não me senti embaraçada

5.Você teve medo de se machucar?

- ☐ Muito medo
- ☐ Medo
- ☐ Pouco medo
- ☐ Não senti medo

6.Se você pudesse escolher entre auto coleta e coleta por profissional de saúde do seu exame de Papanicolaou qual você preferiria?

- ☐ Auto coleta
- ☐ coleta por profissional de saúde
- ☐ indiferente

7.E quais os motivos?

- ☐ Menos dor ou desconforto
- ☐ Menos vergonha ou constrangimento
- ☐ Praticidade
- ☐ Poder colher em casa ou no laboratório
- ☐ Medo de não colher corretamente
- ☐ Confio mais no profissional de saúde

8 Referências

1. Oriel JD. Natural history of genital warts. *Br J Vener Dis*. 1971 Feb;47(1):1-13.
2. Meisels A, Fortin R, Roy M. Condylomatous lesions of the cervix. II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. *Acta Cytol*. 1977 May-Jun;21(3):379-90.
3. de Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol*. 1981 Dec;40(3):932-5.
4. Beachler DC, Tota JE, Silver MI, Kreimer AR, Hildesheim A, Wentzensen N, Schiffman M, Shiels MS. Trends in cervical cancer incidence in younger US women from 2000 to 2013. *Gynecol Oncol*. 2017 Feb;144(2):391-395.
5. Torné A, Alonso I, Puig-Tintoré, Pahisa J. Clinical role of cervical câncer vaccination. When and whom to vaccinate? *Gynecol Oncol*. 2008;110:S15-S16
6. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan. Estimating the global cancer incidence and mortality 2018: GLOBOCAN sources and methods. <http://globocan.iarc.fr/acess>: 2019/06/06
7. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa câncer de colo para 2018. Rio de Janeiro: INCA; 2018 (citado 2018 julho 9). Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao. Acessado em 06/06/19
8. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
9. Zhou J, Frazer, IH. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: LACEY, C. Editor. Papillomavirus: current research on papillomavirus. London: Leeds University Press; p. 93-100, 1996.
10. Alencar TR. Análise da variabilidade genética, filogenia e expressão gênica de HPV de alto risco no Distrito Federal. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2009.
11. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*. 1997;71:321-41.
12. Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*. 1989 Aug;63(8):3261-9.
13. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50.

14. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27.
15. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244-65.
16. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.
17. Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008. Lyon France: IARC; 2007
18. Chow LT, Broker TR. Small DNA tumor viruses. In: Nathan, N.; Ahmed, R.; Gonzales-Scarano, F.; Griffin, DE.; Holmes, K.V.; Murphy, F.A.; Robinson, H.L., eds. *Viral pathogenesis*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. P.267-302.
19. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006 Mar-Apr;16(2):83-97.
20. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):422-49.
21. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989 Dec 20;8(13):4099-105.
22. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):550-60.
23. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leão MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol*. 2001 May;75(10):4705-12.
24. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):471-93.
25. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgrén K, Krogh Gv, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*. 2006 Dec 4;95(11):1459-66.
26. Abul, K, Abbas AH, Lichtman SP. Immunity against pathogens. In *Cellular and Molecular Immunology*, 6 ed, cap. 15, pp. 345-364, Saunders Elsevier, 2009.
27. Andersen JM, Al-Khairi D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod*. 2006 May;74(5):824-31.

28. Boccardo E, Lepique AP, Villa LL. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010 Nov;31(11):1905-12.
29. Stanley MA. Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*. 2009 Sep;130(3):266-76.
30. Hubert P, Caberg JH, Gilles C, Bousarghin L, Franzen-Detrooz E, Boniver J, Delvenne P. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):346-55.
31. Hammes LS, Tekmal RR, Naud P, Edelweiss MI, Kirma N, Valente PT, Syrjänen KJ, Cunha-Filho JS. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation. *Gynecol Oncol*. 2007 Apr;105(1):157-65.
32. Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep;1(5):412-20.
33. Lepique AP, Daghanastanli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4391-400.
34. van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, van den Hende M, Welters MJ, Van Rood JJ, Fleuren GJ, Melief CJ, Kenter GG, Offringa R. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 17;104(29):12087-92.
35. Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C, Man S. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*. 2010 Nov 10;407(1):137-42.
36. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 7;103(10):3822-7.
37. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):3186-97.
38. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Feb;7(1):79-89.
39. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.

40. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.
41. Peto J, Gilham C, Deacon J, Taylor C, Evans C, Binns W, Haywood M, Elanko N, Coleman D, Yule R, Desai M. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. *Br J Cancer*. 2004 Aug 31;91(5):942-53.
42. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*. 1997 May 5;102(5A):3-8.
43. Stanley M. HPV - immune response to infection and vaccination. *Infect Agent Cancer*. 2010 Oct 20;5:19.
44. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.
45. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/42-51.
46. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453-9.
47. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007 Aug 1;121(3):621-32.
48. Castellsagué X, Díaz M, de Sanjosé S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, Peeling RW, Ashley R, Smith JS, Snijders PJ, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Mar 1;98(5):303-15.
49. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2007;90:1-636.
50. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
51. Cheung JL, Cheung TH, Yu MY, Chan PK. Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol*. 2013 Nov;131(2):374-9.
52. Stanley MA, Sterling JC. Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol*. 2014;45:58-74.
53. Woo YL, van den Hende M, Sterling JC, Coleman N, Crawford RA, Kwappenberg KM, Stanley MA, van der Burg SH. A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses. *Int J Cancer*. 2010 Jan 1;126(1):133-41.

54. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2006 May;110(5):525-41.
55. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7.
56. Bradshaw CS, Walker J, Fairley CK, Chen MY, Tabrizi SN, Donovan B, Kaldor JM, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden F, Garland S, Pirotta M, Gurrin L, Hocking JS. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women. *PLoS One*. 2013;8(3):e57688.
57. Chico RM, Mayaud P, Ariti C, Mabey D, Ronsmans C, Chandramohan D. Prevalence of malaria and sexually transmitted and reproductive tract infections in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review. *JAMA*. 2012 May 16;307(19):2079-86.
58. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2011 Jan 11;11:10.
59. Robial R, Longatto-Filho A, Roteli-Martins CM, Silveira MF, Stauffert D, Ribeiro GG, Linhares IM, Tacla M, Zonta MA, Baracat EC. Frequency of *Chlamydia trachomatis* infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining. *Infect Agent Cancer*. 2017 Jan 6;12:3.
60. Zhu H, Shen Z, Luo H, Zhang W, Zhu X. Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(13):e3077.
61. Karim S, Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Cervical Cancer Induction Enhancement Potential of Chlamydia Trachomatis: A Systematic Review. *Curr Microbiol*. 2018 Dec;75(12):1667-1674.
62. Koshiol J, Schroeder J, Jamieson DJ, Marshall SW, Duerr A, Heilig CM, Shah KV, Klein RS, Cu-Uvin S, Schuman P, Celentano D, Smith JS. Smoking and time to clearance of human papillomavirus infection in HIV-seropositive and HIV-seronegative women. *Am J Epidemiol*. 2006 Jul 15;164(2):176-83.
63. Bartsch H, Montesano R. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*. 1984 Nov;5(11):1381-93.
64. Wei L, Griego AM, Chu M, Ozbun MA. Tobacco exposure results in increased E6 and E7 oncogene expression, DNA damage and mutation rates in cells maintaining episomal human papillomavirus 16 genomes. *Carcinogenesis*. 2014 Oct;35(10):2373-81.
65. Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, Doorbar J, Hibma M. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is

- associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol*. 2003 Aug;77(15):8378-85.
66. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, Smith K, Mathews C, Allen RA, Zhang R, Wang S, Wentzensen N. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2013 Feb;128(2):265-70.
67. Brotman RM, He X, Gajer P, Fadrosch D, Sharma E, Mongodin EF, Ravel J, Glover ED, Rath JM. Association between cigarette smoking and the vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2014 Aug 28;14:471.
68. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, Herrero R, Franceschi S; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.
69. Fichorova RN, Chen PL, Morrison CS, Doncel GF, Mendonca K, Kwok C, Chipato T, Salata R, Mauck C. The Contribution of Cervicovaginal Infections to the Immunomodulatory Effects of Hormonal Contraception. *MBio*. 2015 Sep 1;6(5):e00221-15.
70. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539-45.
71. Lăără E, Day NE, Hakama M. Trends in mortality from cervical cancer in the Nordic countries: association with organised screening programmes. *Lancet*. 1987 May 30;1(8544):1247-9.
72. Johannesson G, Geirsson G, Day N. The effect of mass screening in Iceland, 1965-74, on the incidence and mortality of cervical carcinoma. *Int J Cancer*. 1978 Apr 15;21(4):418-25.
73. Sigurdsson K. Effect of organized screening on the risk of cervical cancer. Evaluation of screening activity in Iceland, 1964-1991. *Int J Cancer*. 1993 Jun 19;54(4):563-70.
74. Ault KA. Cervical cancer prevention: better tests, better tools, and more equitable outcomes. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Sep 21;103(18):1352-3.
75. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Désy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1415-23.
76. Trimble CL, Peng S, Thoburn C, Kos F, Wu TC. Naturally occurring systemic immune responses to HPV antigens do not predict regression of CIN2/3. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 May;59(5):799-803.
77. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical

- cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2000 May 16;132(10):810-9.
78. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA.* 1989 Feb 3;261(5):737-43.
79. Sawaya GF, Smith-McCune K. Cervical Cancer Screening. *Obstet Gynecol.* 2016 Mar;127(3):459-67.
80. Longatto-Filho A, Schmitt FC. Cytology education in the 21st century: living in the past or crossing the Rubicon? *Acta Cytol* 2010; 54:654-6.
81. Demay RM. Hyperchromatic crowded groups: pitfalls in pap smear diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2000 Nov;114 Suppl:S36-43.
82. Khalbuss WE. Challenging Cases in GYN Cytology. 2012 Sep 17-19. 4th KAMC Cytopathology Symposium.
83. Ferenczy A, Franco E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001 Jan;2(1):27-32.
84. Monsonogo J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjänen K, Halfon P, Ruiz F, Smith JS. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *Int J Cancer.* 2011 Aug 1;129(3):691-701.
85. Ronco G, Cuzick J, Pierotti P, Cariaggi MP, Dalla Palma P, Naldoni C, Ghiringhello B, Giorgi-Rossi P, Minucci D, Parisio F, Pojer A, Schiboni ML, Sintoni C, Zorzi M, Segnan N, Confortini M. Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial. *BMJ.* 2007 Jul 7;335(7609):28.
86. Schmitt FC, Longatto-Filho A, Valent A, Vielh P. Molecular techniques in cytopathology practice. *J Clin Pathol.* 2008 Mar;61(3):258-67.
87. Longatto-Filho A, Levi JE, Martins TR, Cohen D, Cury L, Villa LL, Eluf-Neto J. Critical Analyses of the Introduction of Liquid-Based Cytology in a Public Health Service of the State of São Paulo, Brazil. *Acta Cytol.* 2015;59(3):273-7.
88. Zhou J, Tomashefski JF Jr, Sawady J, Ferrer H, Khiyami A. The diagnostic value of the ThinPrep pap test in endometrial carcinoma: a prospective study with histological follow-up. *Diagn Cytopathol.* 2013 May;41(5):408-12.
89. Prasad SR. Management strategies and cost effectiveness in the prevention of cervical cancer. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2009;1:17-23. Epub 2009 Jun 5.
90. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, Rådborg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007 Oct 18;357(16):1589-97. Erratum in: *N Engl J Med.* 2008 Oct 9;359(15):1637. Johansson, Bo [added].

91. van Rosmalen J, de Kok IM, van Ballegooijen M. Cost-effectiveness of cervical cancer screening: cytology versus human papillomavirus DNA testing. *BJOG*. 2012 May;119(6):699-709.
92. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Mar 2;103(5):368-83.
93. Franco EL, Mahmud SM, Tota J, Ferenczy A, Coutlée F. The expected impact of HPV vaccination on the accuracy of cervical cancer screening: the need for a paradigm change. *Arch Med Res*. 2009 Aug;40(6):478-85.
94. Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, Keller T, von Knebel Doeberitz M, Neumann HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R; PALMS Study Group. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Oct 16;105(20):1550-7.
95. Longatto-Filho A, Naud P, Derchain SF, Roteli-Martins C, Tatti S, Hammes LS, Sarian LO, Eržen M, Branca M, de Matos JC, Gontijo R, Maeda MY, Lima T, Costa S, Syrjänen S, Syrjänen K. Performance characteristics of Pap test, VIA, VILI, HR-HPV testing, cervicography, and colposcopy in diagnosis of significant cervical pathology. *Virchows Arch*. 2012 Jun;460(6):577-85.
96. Flanagan SM, Wilson S, Luesley D, Damery SL, Greenfield SM. Adverse outcomes after colposcopy. *BMC Womens Health*. 2011 Jan 20;11:2.
97. Bansal M, Li Z, Zhao C. Correlation of histopathologic/cytologic follow-up findings with vaginal ASC-US and ASC-H Papanicolaou test and HPV test results. *Am J Clin Pathol*. 2012 Mar;137(3):437-43.
98. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Mürger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 26;109(26):10516-21.
99. Andersson S, Mints M, Wilander E. Results of cytology and high-risk human papillomavirus testing in females with cervical adenocarcinoma in situ. *Oncol Lett*. 2013 Jul;6(1):215-219. Epub 2013 May 15.
100. Mulhem E, Amin M, Copeland J, Sharma J, Hunter S. Type-specific human papillomavirus DNA detected in atypical glandular cell Pap tests. *Acta Cytol*. 2012;56(2):155-9.
101. Schnatz PF, Sharpless KE, O'Sullivan DM. Use of human papillomavirus testing in the management of atypical glandular cells. *J Low Genit Tract Dis*. 2009 Apr;13(2):94-101.
102. Costa S, Negri G, Sideri M, Santini D, Martinelli G, Venturoli S, Pelusi C, Syrjanen S, Syrjanen K, Pelusi G. Human papillomavirus (HPV) test and PAP smear as predictors of outcome in conservatively treated adenocarcinoma in situ (AIS) of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 2007 Jul;106(1):170-6.

103. Schorge JO, Rauh-Hain JA. Atypical glandular cells. *Clin Obstet Gynecol*. 2013 Mar;56(1):35-43.
104. Carter RL, Kang L, Darcy KM, Kauderer J, Liao SY, Rodgers WH, Walker JL, Lankes HA, Dunn ST, Stanbridge EJ. A modified Latent Class Model assessment of human papillomavirus-based screening tests for cervical lesions in women with atypical glandular cells: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer Causes Control*. 2012 Dec;23(12):2013-21.
105. Dahlström LA, Ylitalo N, Sundström K, Palmgren J, Ploner A, Eloranta S, Sanjeevi CB, Andersson S, Rohan T, Dillner J, Adami HO, Sparén P. Prospective study of human papillomavirus and risk of cervical adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Oct 15;127(8):1923-30.
106. Zeferino LC, Rabelo-Santos SH, Villa LL, Sarian LO, Costa MC, do Amaral Westin MC, de Ângelo-Andrade LA, Derchain S. Value of HPV-DNA test in women with cytological diagnosis of atypical glandular cells (AGC). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Nov;159(1):160-4.
107. Schiffman M, Wentzensen N. Transitioning to a new era in cervical cancer screening. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):175-7.
108. Wentzensen N, Schiffman M, Palmer T, Arbyn M. Triage of HPV positive women in cervical cancer screening. *J Clin Virol*. 2016 Mar;76 Suppl 1:S49-S55.
109. 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. *Gynecol Oncol*. 2015 Feb;136(2):189-97.
110. Wentzensen N, Fetterman B, Castle PE, Schiffman M, Wood SN, Stiemerling E, Tokugawa D, Bodelon C, Poitras N, Lorey T, Kinney W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Sep 15;107(12):djv257.
111. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol*. 2001 Nov;2(11):698-704.
112. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 2004 Nov;78(21):11451-60.
113. Bergeron C, Ronco G, Reuschenbach M, Wentzensen N, Arbyn M, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer*. 2015 Jun 15;136(12):2741-51.
114. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. 2007;23(4):315-30.
115. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, Carosi M, Vocaturo G, Benevolo M. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology:

- correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012 Aug;126(2):198-202.
116. Reuschenbach M, Wentzensen N, Dijkstra MG, von Knebel Doeberitz M, Arbyn M. p16INK4a immunohistochemistry in cervical biopsy specimens: A systematic review and meta-analysis of the interobserver agreement. *Am J Clin Pathol*. 2014 Dec;142(6):767-72.
 117. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M, Del Mistro A, Sani C, De Marco L, Girlando S, Rosso S, Naldoni C, Dalla Palma P, Zorzi M, Giorgi-Rossi P, Segnan N, Cuzick J, Ronco G; NTCC working group. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013 Feb;14(2):168-76.
 118. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, Balfoort-van der Meij GA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. Triage HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *Int J Cancer*. 2015 May 15; 136(10):2361-8.
 119. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011 Jun 1;121(3):505-9.
 120. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, Schiffman M. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 1;18(15):4154-62.
 121. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, Ridder R. Triage HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017 Jan;144(1):51-56.
 122. Ovestad IT, Dalen I, Hansen E, Loge JL, Dybdahl BM, Dirdal MB, Moltu P, Berland JM. Clinical value of fully automated p16/Ki-67 dual staining in the triage of HPV-positive women in the Norwegian Cervical Cancer Screening Program. *Cancer Cytopathol*. 2017 Apr;125(4):283-291.
 123. Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*. 2015 Jul 31
 124. Beal CM, Salmerón J, Flores YN, Torres L, Granados-García V, Dugan E, Lazcano-Ponce E. Cost analysis of different cervical cancer screening strategies in Mexico. *Salud Publica Mex*. 2014 Sep-Oct;56(5):429-501.
 125. Termini L, Filho AL, Maciag PC, Etlinger D, Alves VA, Nonogaki S, Soares FA, Villa LL. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia. *Dis Markers*. 2011;30(6):275-81.

126. Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, Song X, Luo Y. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7230-9.
127. Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer AM, Richie JP Jr, Lazarus P, Muscat JE. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan 1;46(1):20-4.
128. Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2010 Apr 22;29(16):2309-24.
129. Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, Di Pietro A, Spataro P, Bertuccio MP. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol*. 2016 Feb;88(2):336-44.
130. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1-13.
131. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):275-95.
132. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):344-56.
133. Piantá CD. A influência do polimorfismo do superóxido dismutase de manganês na morbi-mortalidade pós-operatória de pacientes submetidos a cirurgias oncológicas 2005. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
134. Robbins D, Zhao Y. Manganese superoxide dismutase in cancer prevention. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Apr 1;20(10):1628-45.
135. Alvarez KLF, Beldi M, Sarmanho F, Rossetti RAM, Silveira CRF, Mota GR, Andreoli MA, Caruso EDC, Kamillos MF, Souza AM, Mastrocalla H, Clavijo-Salomon MA, Barbuto JAM, Lorenzi NP, Longatto-Filho A, Baracat E, Lopez RVM, Villa LL, Tacla M, Lepique AP. *Sci Rep*. 2017 Aug 21;7(1):9002.
136. Silveira CRF, Cipelli M, Manzine C, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC, Rodríguez Rodríguez G, de Assis JB, Hebster S, Bernadinelli I, Laginha F, Boccardo E, Villa LL, Termini L, Lepique AP. Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population. *PLoS One*. 2019 Mar 6;14(3):e0213184.
137. Gravitt PE, Paul P, Katki HA, Vendantham H, Ramakrishna G, Sudula M, Kalpana B, Ronnett BM, Vijayaraghavan K, Shah KV; CATCH Study Team. Effectiveness of VIA, Pap, and HPV DNA testing in a cervical cancer screening program in a peri-urban community in Andhra Pradesh, India. *PLoS One*. 2010 Oct 28;5(10):e13711.

138. Nguyen AQ, Mandigo M, Coleman JS. Cervical Cancer Screening for Women With Disabilities: Time for a New Approach? *J Low Genit Tract Dis*. 2018 Oct;22(4):318-319.
139. Isidean SD, Coutlée F, Franco EL. cobas 4800 HPV Test, a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of human papillomavirus in cervical specimens. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Jan;14(1):5-16.
140. Cerigo H, Macdonald ME, Franco EL, Brassard P. Inuit women's attitudes and experiences towards cervical cancer and prevention strategies in Nunavik, Quebec. *Int J Circumpolar Health*. 2012 Mar 19;71:17996.
141. Cerigo H, Coutlée F, Franco EL, Brassard P. Dry self-sampling versus provider-sampling of cervicovaginal specimens for human papillomavirus detection in the Inuit population of Nunavik, Quebec. *J Med Screen*. 2012 Mar;19(1):42-8.
142. Leinonen MK, Schee K, Jonassen CM, Lie AK, Nystrand CF, Rangberg A, Furre IE, Johansson MJ, Tropé A, Sjøborg KD, Castle PE, Nygård M. Safety and acceptability of human papillomavirus testing of self-collected specimens: A methodologic study of the impact of collection devices and HPV assays on sensitivity for cervical cancer and high-grade lesions. *J Clin Virol*. 2018 Feb - Mar;99-100:22-30.
143. Ogilvie GS, Krajden M, van Niekerk D, Smith LW, Cook D, Ceballos K, Lee M, Gentile L, Gondara L, Elwood-Martin R, Peacock S, Stuart G, Franco EL, Coldman AJ. HPV for cervical cancer screening (HPV FOCAL): Complete Round 1 results of a randomized trial comparing HPV-based primary screening to liquid-based cytology for cervical cancer. *Int J Cancer*. 2017 Jan 15;140(2):440-448.
144. Sellors JW, Lorincz AT, Mahony JB, Mielzynska I, Lytwyn A, Roth P, Howard M, Chong S, Daya D, Chapman W, Chernesky M. Comparison of self-collected vaginal, vulvar and urine samples with physician-collected cervical samples for human papillomavirus testing to detect high-grade squamous intraepithelial lesions. *CMAJ*. 2000 Sep 5;163(5):513-8.
145. Seo SS, Song YS, Kim JW, Park NH, Kang SB, Lee HP. Good correlation of HPV DNA test between self-collected vaginal and clinician-collected cervical samples by the oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*. 2006 Jul;102(1):67-73.
146. Szarewski A, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Edwards R, Lyons D, Walker J, Christison J, Frater A, Waller J. HPV self-sampling as an alternative strategy in non-attenders for cervical screening - a randomised controlled trial. *Br J Cancer*. 2011 Mar 15;104(6):915-20.
147. Virtanen A, Nieminen P, Luostarinen T, Anttila A. Self-sample HPV tests as an intervention for nonattendees of cervical cancer screening in Finland: a randomized trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011 Sep;20(9):1960-9.
148. Deschamps M, Band PR, Hislop TG, Clarke HF, Smith JM, To Yee Ng V. Barriers to cervical cytology screening in native women in British Columbia. *Cancer Detect Prev*. 1992;16(5-6):337-9.

149. Lindau ST, Hoffmann JN, Lundeen K, Jaszczak A, McClintock MK, Jordan JA. Vaginal self-swab specimen collection in a home-based survey of older women: methods and applications. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2009 Nov;64 Suppl 1:i106-18.
150. Barbee L, Kobetz E, Menard J, Cook N, Blanco J, Barton B, Auguste P, McKenzie N. Assessing the acceptability of self-sampling for HPV among Haitian immigrant women: CBPR in action. *Cancer Causes Control*. 2010 Mar;21(3):421-31.
151. Braz NS, Lorenzi NP, Sorpreso IC, Aguiar LM, Baracat EC, Soares-Júnior JM. The acceptability of vaginal smear self-collection for screening for cervical cancer: a systematic review. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017 Mar;72(3):183-187.
152. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathol*. 2015 May;123(5):271-81.
153. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2114-9.
154. Daniel WW. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences, 10th Edition, John Wiley & Sons, New York, 2013.
155. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry* 39:561-577, 1993.
156. Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos Saúde Coletiva*, 11(1):7-31, 2003.
157. Gardner IA, Greiner M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology* 35:8-17, 2006
158. Zhou XH, NA Obuchowski, DK McClish. Statistical methods in diagnostic medicine. New York: Wiley, 2002.
159. Altman DG, Machin D, Bryant TN, Gardner MJ (Eds). Statistics with confidence, 2nd ed. BMJ Books, 2000.
160. Mercaldo ND, Lau KF, Zhou XH. Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. *Statistics in Medicine* 26:2170-2183, 2007
161. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-75.
162. Sultana F, Mullins R, English DR, Simpson JA, Drennan KT, Heley S, Wrede CD, Brotherton JM, Saville M, Gertig DM. Women's experience with home-based self-sampling for human papillomavirus testing. *BMC Cancer*. 2015 Nov 4;15:849.

163. Stewart DE, Gagliardi A, Johnston M, Howlett R, Barata P, Lewis N, Oliver T, Mai V; HPV Self-collection Guidelines Panel. Self-collected samples for testing of oncogenic human papillomavirus: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007 Oct;29(10):817-28.
164. Zehbe I, Wakewich P, King AD, Morrisseau K, Tuck C. Self-administered versus provider-directed sampling in the Anishinaabek Cervical Cancer Screening Study (ACCSS): a qualitative investigation with Canadian First Nations women. *BMJ Open.* 2017 Sep 1;7(8):e017384.
165. Nelson EJ, Maynard BR, Loux T, Fatla J, Gordon R, Arnold LD. The acceptability of self-sampled screening for HPV DNA: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2017 Feb;93(1):56-61.
166. El-Zeina M, Boutena S, Louvanto K, Gilbert L, Gottlieb W, Hemmings R, Behr MA, Franco EL; CASSIS Study Group. Validation of a new HPV self-sampling device for cervical cancer screening: The Cervical and Self-Sample In Screening (CASSIS) study. *Gynecol Oncol.* 2018 Jun;149(3):491-497.
167. Patnick J. NHS Cervical Screening Programme Annual Review 2008. Sheffield: NHSCSP, 2008.
168. Szarewski A, Cadman L, Ashdown-Barr L, Waller J. Exploring the acceptability of two self-sampling devices for human papillomavirus testing in the cervical screening context: a qualitative study of Muslim women in London. *J Med Screen.* 2009;16(4):193-8.
169. Gravitt PE, Belinson JL, Salmeron J, Shah KV. Looking ahead: a case for human papillomavirus testing of self-sampled vaginal specimens as a cervical cancer screening strategy. *Int J Cancer.* 2011 Aug 1;129(3):517-27.
170. Duke P, Godwin M, Ratnam S, Dawson L, Fontaine D, Lear A, Traverso-Yeppez M, Graham W, Ravalia M, Mugford G, Pike A, Fortier J, Peach M. Effect of vaginal self-sampling on cervical cancer screening rates: a community-based study in Newfoundland. *BMC Womens Health.* 2015 Jun 10;15:47.
171. Barata PC, Mai V, Howlett R, Gagliardi AR, Stewart DE. Discussions about self-obtained samples for HPV testing as an alternative for cervical cancer prevention. *J Psychosom Obstet Gynaecol.* 2008 Dec;29(4):251-7.
172. Forrest S, McCaffery K, Waller J, Desai M, Szarewski A, Cadman L, Wardle J. Attitudes to self-sampling for HPV among Indian, Pakistani, African-Caribbean and white British women in Manchester, UK. *J Med Screen.* 2004;11(2):85-8.
173. Lazcano-Ponce E, Lorincz AT, Cruz-Valdez A, Salmerón J, Uribe P, Velasco-Mondragón E, Nevarez PH, Acosta RD, Hernández-Avila M. Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomised controlled trial. *Lancet.* 2011 Nov 26;378(9806):1868-73.
174. Zhao FH, Lewkowitz AK, Chen F, Lin MJ, Hu SY, Zhang X, Pan QJ, Ma JF, Niyazi M, Li CQ, Li SM, Smith JS, Belinson JL, Qiao YL, Castle PE. Pooled analysis of a

- self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Feb 8;104(3):178-88.
175. Arbyn M, Verdoodt F, Snijders PJ, Verhoef VM, Suonio E, Dillner L, Minozzi S, Bellisario C, Banzi R, Zhao FH, Hillemanns P, Anttila A. Accuracy of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2014 Feb;15(2):172-83.
176. Bansil P, Wittet S, Lim JL, Winkler JL, Paul P, Jeronimo J. Acceptability of self-collection sampling for HPV-DNA testing in low-resource settings: a mixed methods approach. *BMC Public Health.* 2014 Jun 12;14:596.
177. Goldie SJ, Gaffikin L, Goldhaber-Fiebert JD, Gordillo-Tobar A, Levin C, Mahé C, Wright TC; Alliance for Cervical Cancer Prevention Cost Working Group. Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *N Engl J Med.* 2005 Nov 17;353(20):2158-68.
178. Racey CS, Gesink DC. Barriers and Facilitators to Cervical Cancer Screening Among Women in Rural Ontario, Canada: The Role of Self-Collected HPV Testing. *J Rural Health.* 2016 Spring;32(2):136-45.
179. Waller J, Jackowska M, Marlow L, Wardle J. Exploring age differences in reasons for nonattendance for cervical screening: a qualitative study. *BJOG.* 2012 Jan;119(1):26-32.
180. Casillas J, Goyal A, Bryman J, Alquaddoomi F, Ganz PA, Lidington E, Macadangdang J, Estrin D. Development of a text messaging system to improve receipt of survivorship care in adolescent and young adult survivors of childhood cancer. *J Cancer Surviv.* 2017 Aug;11(4):505-516.
181. Huynh J, Howard M, Lytwyn A. Self-collection for vaginal human papillomavirus testing: systematic review of studies asking women their perceptions. *J Low Genit Tract Dis.* 2010 Oct;14(4):356-62.
182. Allen-Leigh B, Uribe-Zúñiga P, León-Maldonado L, Brown BJ, Lörincz A, Salmeron J, Lazcano-Ponce E. Barriers to HPV self-sampling and cytology among low-income indigenous women in rural areas of a middle-income setting: a qualitative study. *BMC Cancer.* 2017 Nov 9;17(1):734.
183. Borges AM, Lejuez CW, Felton JW. Positive alcohol use expectancies moderate the association between anxiety sensitivity and alcohol use across adolescence. *Drug Alcohol Depend.* 2018 Jun 1;187:179-184.
184. Madzima TR, Vahabi M, Lofters A. Emerging role of HPV self-sampling in cervical cancer screening for hard-to-reach women: Focused literature review. *Can Fam Physician.* 2017 Aug;63(8):597-601.
185. Ketelaars PJW, Bosgraaf RP, Siebers AG, Massuger LFAG, van der Linden JC, Wauters CAP, Rahamat-Langendoen JC, van den Brule AJC, Int'Hout J, Melchers WJG, Bekkers RLM. High-risk human papillomavirus detection in self-sampling compared to physician-taken smear in a responder population of the Dutch cervical screening: Results of the VERA study. *Prev Med.* 2017 Aug;101:96-101.

186. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12-9.
187. Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*. 2009 Oct;45(15):2640-8.
188. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):1095-101.
189. Brotherton JM, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. Early effect of the HPV vaccination programme on cervical abnormalities in Victoria, Australia: an ecological study. *Lancet*. 2011 Jun 18;377(9783):2085-92.
190. Drolet M, Bénard É, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JM, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliwer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, Mboup A, Mesher D, Niccolai L, Oliphant J, Pollock KG, Soldan K, Sonnenberg P, Tabrizi SN, Tanton C, Brisson M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015 May;15(5):565-80.
191. Ogilvie GS, Naus M, Money DM, Dobson SR, Miller D, Krajden M, van Niekerk DJ, Coldman AJ. Reduction in cervical intraepithelial neoplasia in young women in British Columbia after introduction of the HPV vaccine: An ecological analysis. *Int J Cancer*. 2015 Oct 15;137(8):1931-7.
192. El-Zein M, Richardson L, Franco EL. Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: Cytology, molecular testing, both or none. *J Clin Virol*. 2016 Mar;76 Suppl 1:S62-S68.
193. Isidean SD, Mayrand MH, Ramanakumar AV, Gilbert L, Reid SL, Rodrigues I, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL; CCCaST Study Group. Human papillomavirus testing versus cytology in primary cervical cancer screening: End-of-study and extended follow-up results from the Canadian cervical cancer screening trial. *Int J Cancer*. 2016 Dec 1;139(11):2456-66.
194. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlée F, Franco EL; Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 18;357(16):1579-88.
195. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhello B, Girlando S, Gillio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J; New Technologies for Cervical Cancer screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical

- intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010 Mar;11(3):249-57.
196. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ; International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):524-32.
197. Adegoke O, Kulasingam S, Virnig B. Cervical cancer trends in the United States: a 35-year population-based analysis. *J Womens Health (Larchmt).* 2012 Oct;21(10):1031-7.
198. Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Screening and adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer.* 2009 Aug 1;125(3):525-9.
199. de Cremoux P, Coste J, Sastre-Garau X, Thioux M, Bouillac C, Labbé S, Cartier I, Ziol M, Dosda A, Le Galès C, Molinié V, Vacher-Lavenu MC, Cochand-Priollet B, Vielh P, Magdelénat H; French Society of Clinical Cytology Study Group. Efficiency of the hybrid capture 2 HPV DNA test in cervical cancer screening. A study by the French Society of Clinical Cytology. *Am J Clin Pathol.* 2003 Oct;120(4):492-9.
200. Herrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist?--revisited. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):1-3.
201. Kerner J, Liu J, Wang K, Fung S, Landry C, Lockwood G, Zitzelsberger L, Mai V. Canadian cancer screening disparities: a recent historical perspective. *Curr Oncol.* 2015 Apr;22(2):156-63.
202. Spayne M, Rabeneck L, Guerriero L. Successes and challenges in population-based cancer screening. *Healthc Q.* 2015;17 Spec No:16-22.
203. Torres KL, Mariño JM, Pires Rocha DA, de Mello MB, de Melo Farah HH, Reis RDS, Alves VDCR, Gomes E, Martins TR, Soares AC, de Oliveira CM, Levi JE. Self-sampling coupled to the detection of HPV 16 and 18 E6 protein: A promising option for detection of cervical malignancies in remote areas. *PLoS One.* 2018 Jul 23;13(7):e0201262.
204. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009 Feb 1;124(3):516-20.
205. Polman NJ, Ebisch RMF, Heideman DAM, Melchers WJG, Bekkers RLM, Molijn AC, Meijer CJLM, Quint WGV, Snijders PJF, Massuger LFAG, van Kemenade FJ, Berkhof J. Performance of human papillomavirus testing on self-collected versus clinician-collected samples for the detection of cervical intraepithelial neoplasia of grade 2 or worse: a randomised, paired screen-positive, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2019 Feb;20(2):229-238.
206. Belinson JL, Hu S, Niyazi M, Pretorius RG, Wang H, Wen C, Smith JS, Li J, Taddeo FJ, Burchette RJ, Qiao YL. Prevalence of type-specific human papillomavirus in

- endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: Implications for vaginal self-collection. *Int J Cancer*. 2010 Sep 1;127(5):1151-7.
207. Bosgraaf RP, Verhoef VM, Massuger LF, Siebers AG, Bulten J, de Kuyper-de Ridder GM, Meijer CJ, Snijders PJ, Heideman DA, Int'Hout J, van Kemenade FJ, Melchers WJ, Bekkers RL. Comparative performance of novel self-sampling methods in detecting high-risk human papillomavirus in 30,130 women not attending cervical screening. *Int J Cancer*. 2015 Feb 1;136(3):646-55.
 208. Racey CS, Withrow DR, Gesink D. Self-collected HPV testing improves participation in cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Can J Public Health*. 2013 Feb 11;104(2):e159-66.
 209. Smith LW, Khurshed F, van Niekerk DJ, Krajden M, Greene SB, Hobbs S, Coldman AJ, Franco EL, Ogilvie GS. Women's intentions to self-collect samples for human papillomavirus testing in an organized cervical cancer screening program. *BMC Public Health*. 2014 Oct 10;14:1060.
 210. Bruno A, Serravalle K, Travassos AG, Lima BGC. Distribuição dos genótipos de Papilomavírus humano em mulheres do estado da Bahia, Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2014;36(9): 416-22.
 211. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Sep;110(3 Suppl 2):S4-7.
 212. Martins TR. Citologia líquida e teste molecular para HPV de alto risco: avaliação de novas modalidades de rastreio para prevenção do câncer do colo do útero na rede pública de saúde do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado, FMUSP, 2016.
 213. Baldez da Silva MF, Chagas BS, Guimarães V, Katz LM, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DB, Lima Filho JL, Stocco RC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res*. 2009 Dec 1;8(4):1437-43.
 214. Wright TC Jr, Stoler MH, Agreda PM, Beitman GH, Gutierrez EC, Harris JM, Koch KR, Kuebler M, LaViers WD, Legendre BL Jr, Leitch SV, Maus CE, McMillian RA, Nussbaumer WA, Palmer ML, Porter MJ, Richart GA, Schwab RJ, Vaughan LM. Clinical performance of the BD Onclarity HPV assay using an adjudicated cohort of BD SurePath liquid-based cytology specimens. *Am J Clin Pathol*. 2014 Jul;142(1):43-50.
 215. Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, de Borja PC, Sanchez N, Zahaf T, Catteau G, Geeraerts B, Descamps D. Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):2147-62.
 216. Jura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, Garland SM, Giuliano AR, Hernandez-Avila M, Huh W, Iversen OE, Kjaer SK, Luna J, Miller D, Monson J, Munoz N, Myers E, Paavonen J, Pitisuttithum P, Steben M, Wheeler CM, Perez G, Saah A, Luxembourg A, Sings HL, Velicer C. Attribution of 12 high-risk human

- papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Oct;23(10):1997-2008.
217. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, de Sanjosé S, Castellsagué X. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health.* 2016 Jul;4(7):e453-63.
218. Wright TC Jr, Stoler MH, Behrens CM, Apple R, Derion T, Wright TL. The ATHENA human papillomavirus study: design, methods, and baseline results. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Jan;206(1):46.e1-46.e11.
219. Moscicki AB, Cox JT. Practice improvement in cervical screening and management (PICSM): symposium on management of cervical abnormalities in adolescents and young women. *J Low Genit Tract Dis.* 2010 Jan;14(1):73-80.
220. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shiboski S. Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet Gynecol.* 2010 Dec;116(6):1373-80.
221. Louvanto K, Franco EL, Ramanakumar AV, Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Koushik A, Cuzick J, Coutlée F, Lorincz AT; Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Methylation of viral and host genes and severity of cervical lesions associated with human papillomavirus type 16. *Int J Cancer.* 2015 Mar 15;136(6):E638-45.
222. Verhoef VM, Bosgraaf RP, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Heideman DA, Hesselink AT, Bekkers RL, Steenbergen RD, Massuger LF, Melchers WJ, Bulten J, Overbeek LI, Berkhof J, Snijders PJ, Meijer CJ. Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROHTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2014 Mar;15(3):315-22.
223. Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, Berkhof J, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Ter Harmsel WA, van Baal WM, Graziosi PG, Quint WG, Spruijt JW, van Dijken DK, Heideman DA, Meijer CJ. p16/Ki-67 dual-stained cytology for detecting cervical (pre)cancer in a HPV-positive gynecologic outpatient population. *Mod Pathol.* 2016 Aug;29(8):870-8.
224. Gustinucci D, Giorgi Rossi P, Cesarini E, Broccolini M, Bulletti S, Cariani A, D'angelo V, D'amico MR, Di Dato E, Galeazzi P, Malaspina M, Martinelli N, Spita N, Tintori B, Giaino MD, Passamonti B. Use of Cytology, E6/E7 mRNA, and p16INK4a-Ki-67 to Define the Management of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Women in Cervical Cancer Screening. *Am J Clin Pathol.* 2016 Jan
225. Areán-Cuns C, Mercado-Gutiérrez M, Paniello-Alastruey I, Mallor-Giménez F, Córdoba-Iturriagagoitia A, Lozano-Escario M, Santamaria-Martínez M. Dual staining for p16/Ki67 is a more specific test than cytology for triage of HPV-positive women. *Virchows Arch.* 2018 Nov;473(5):599-606.
226. Stanczuk GA, Baxter GJ, Currie H, Forson W, Lawrence JR, Cuschieri K, Wilson A, Patterson L, Govan L, Black J, Palmer T, Arbyn M. Defining Optimal Triage

- Strategies for hrHPV Screen-Positive Women-An Evaluation of HPV 16/18 Genotyping, Cytology, and p16/Ki-67 Cytoimmunochemistry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017 Nov;26(11):1629-1635.
227. Wentzensen N, Fetterman B, Tokugawa D, Schiffman M, Castle PE, Wood SN, Stiemerling E, Poitras N, Lorey T, Kinney W. Interobserver reproducibility and accuracy of p16/Ki-67 dual-stain cytology in cervical cancer screening. *Cancer Cytopathol.* 2014 Dec;122(12):914-20.
228. Benevolo M, Allia E, Gustinucci D, Rollo F, Bulletti S, Cesarini E, Passamonti B, Giovagnoli MR, Carico E, Carozzi FM, Mongia A, Fantacci G, Confortini M, Rubino T, Fodero C, Prandi S, Marchi N, Farruggio A, Coccia A, Macrì L, Ghiringhello B, Ronco G, Bragantini E, Polla E, Maccallini V, Negri G, Giorgi Rossi P; New Technologies for Cervical Cancer Screening 2 (NTCC2) Working Group. Interobserver reproducibility of cytologic p16(INK4a) /Ki-67 dual immunostaining in human papillomavirus-positive women. *Cancer Cytopathol.* 2017 Mar;125(3):212-220.
229. Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer.* 2018 Feb 1;142(3):440-448.
230. Huang L, Zheng M, Zhou QM, Zhang MY, Jia WH, Yun JP, Wang HY. Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer.* 2011 Aug 1;117(15):3363-73.
231. Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, Costa MC, Lima Nunes RA, Lucci Ângelo-Andrade LA, Villa LL, Zeferino LC. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget.* 2018 Apr 24;9(31):21630-21640.
232. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaides E, Li JV, Holmes E, Nicholson JK, Bennett PR, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015 Nov 17;5:16865.
233. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, Hong KM, Kim HK, Kim MK. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Jul;21(7):674.e1-9.
234. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, Djukovic D, Hoffman NG, Raftery D, Marrazzo JM, Fredricks DN. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *MBio.* 2015 Apr 14;6(2). pii: e00204-15.
235. Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol.* 2014 Jun;88(12):6751-61.
236. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016 May;9(5):357-66.

237. Silveira CRF, Cipelli M, Manzine C, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC, Rodríguez Rodríguez G, de Assis JB, Hebster S, Bernadinelli I, Laginha F, Boccardo E, Villa LL, Termini L, Lepique AP. Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population. *PLoS One*. 2019 Mar 6;14(3):e0213184.
238. Alvarez KLF, Beldi M, Sarmanho F, Rossetti RAM, Silveira CRF, Mota GR, Andreoli MA, Caruso EDC, Kamillos MF, Souza AM, Mastrocalla H, Clavijo-Salomon MA, Barbuto JAM, Lorenzi NP, Longatto-Filho A, Baracat E, Lopez RVM, Villa LL, Tacla M, Lepique AP. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. *Sci Rep*. 2017 Aug 21;7(1):9002.
239. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Meijer CJ, Walboomers JM, Goldman S, Svensson C, Adami HO, Melbye M. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med*. 1997 Nov 6;337(19):1350-8.
240. Scholefield JH, Hickson WG, Smith JH, Rogers K, Sharp F. Anal intraepithelial neoplasia: part of a multifocal disease process. *Lancet*. 1992 Nov 21;340(8830):1271-3.
241. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F12-23.
242. Stanley MA, Winder DM, Sterling JC, Goon PK. HPV infection, anal intra-epithelial neoplasia (AIN) and anal cancer: current issues. *BMC Cancer*. 2012 Sep 8;12:398.
243. Daling JR, Weiss NS, Hislop TG, Maden C, Coates RJ, Sherman KJ, Ashley RL, Beagrie M, Ryan JA, Corey L. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med*. 1987 Oct 15;317(16):973-7.
244. Madeleine MM, Finch JL, Lynch CF, Goodman MT, Engels EA. HPV-related cancers after solid organ transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2013 Dec;13(12):3202-9.
245. Hou JY, Smotkin D, Grossberg R, Suhrland M, Levine R, Smith HO, Negassa A, McAndrew TC, Einstein MH. High prevalence of high grade anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected women screened for anal cancer. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Jun 1;60(2):169-72.
246. Saleem AM, Paulus JK, Shapter AP, Baxter NN, Roberts PL, Ricciardi R. Risk of anal cancer in a cohort with human papillomavirus-related gynecologic neoplasm. *Obstet Gynecol*. 2011 Mar;117(3):643-9.
247. Park IU, Ogilvie JW Jr, Anderson KE, Li ZZ, Darrah L, Madoff R, Downs L Jr. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2009 Sep;114(3):399-403.
248. Cromwell I, Gaudet M, Peacock SJ, Aquino-Parsons C. Cost-effectiveness analysis of anal cancer screening in women with cervical neoplasia in British Columbia, Canada. *BMC Health Serv Res*. 2016 Jun 27;16:206.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Age-related acceptability of vaginal self-sampling in cervical cancer screening at two university hospitals: a pilot cross-sectional study

Noely Paula Cristina Lorenzi^{1*}, Lara Termini², Adhemar Longatto Filho^{3,4,5,6}, Maricy Tacla⁷, Lana Maria de Aguiar⁷, Mariana Carmezim Beldi⁷, Edson Santos Ferreira-Filho⁷, Edmund Chada Baracat⁷ and José Maria Soares-Júnior⁷

Abstract

Background: To determine whether age is a barrier against acceptability of cervicovaginal self-sampling in screening for cervical cancer at two gynecology outpatient clinics.

Methods: This is a cross-sectional study involving 116 women over 21 years of age with an abnormal Pap smear. Clinical and laboratorial data were recorded in electronic files. Women received detailed self-collection instructions. After the self-sampling procedure (Evalyn Brush®), women were instructed to answer a questionnaire about vaginal self-sampling acceptability that consisted of seven multiple-choice items. The participants were divided into three age brackets: 21 to 29 years, 30 to 49 years, and 50 years and over. Chi-square, Fischer exact, Kolmogorov-Smirnov and Kruskal-Wallis tests were used.

Results: The analysis of the participants' perception of the procedure stratified according to age groups showed a decline in the fear of hurting oneself during the procedure as age increased. Most participants reported that it was very easy to understand how to use the self-sampling brush and that it was easy to use it. Most of them were neither embarrassed nor afraid of getting hurt during the procedure. The majority preferred self-sampling to collection by a healthcare professional. The main reason was practicality: the possibility of choosing the place and time for sampling.

Conclusions: The participating women found self-collection simple to understand and easy to accept regardless of age. The younger women indicated more fear and discomfort in self-sampling, which points to the need for attraction strategies that are more appealing to the younger generations.

Keywords: Vaginal self-sampling, Cervical cancer screening, Human papillomavirus

Background

Cervical cancer is one of the leading causes of death from cancer in adult women [1]. In Brazil in 2012, there were 17,540 new cases, with an estimated risk of 17 cases for every 100,000 women [2]. Brazilian Health Ministry launched the National Program for the Control of Cervical Cancer to decrease the incidence rate.

However, more than 6 years later, the incidence of cervical cancer remained high, with 16,370 cases reported [3]. For example, Amazonas, a state in northern Brazil with many public health issues, has the highest cervical cancer incidence in the country, with 37.1 registered cases per 100,000 women. Even in the state of São Paulo, which has one of the best structured health care systems in Brazil, the incidence is still high with 9.5 cases per 100,000 women [3].

The low socioeconomic status of the population may partially justify the persistence of the problem, for it prevents easy access to healthcare. However, in larger

* Correspondence: noelylorenzi@gmail.com; noelylorenzi@hcfm.usp.br

¹Hospital Universitário (H-U-USP), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.