



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE  
PÚBLICA**

**KEILA PATRÍCIA ALMEIDA DE CARVALHO**

---

**ESTADIAMENTO, GENÓTIPOS DE HPV E METILAÇÃO DO GENE *WIFI*  
EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: ASSOCIAÇÕES COM O  
PROGNÓSTICO E SOBREVIDA**

---

**Goiânia**

**2016**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS  
TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA  
UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**  **Dissertação**  **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Keila Patrícia Almeida de Carvalho

Título do trabalho: ESTADIAMENTO, GENÓTIPOS DE HPV E METILAÇÃO DO GENE WIF1 EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: ASSOCIAÇÕES COM O PROGNÓSTICO E SOBREVIVÊNCIA

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  **SIM**  **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Keila Patrícia A. de Carvalho

Data: 17 / 11 / 2016

Assinatura do (a) autor (a) <sup>2</sup>

**KEILA PATRÍCIA ALMEIDA DE CARVALHO**

---

**ESTADIAMENTO, GENÓTIPOS DE HPV E METILAÇÃO DO GENE *WIFI*  
EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: ASSOCIAÇÕES COM O  
PROGNÓSTICO E SOBREVIVÊNCIA**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública, com concentração na área de Patologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Helena Rabelo dos Santos.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Aparecida Saddi

Goiânia

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Almeida de Carvalho, Keila Patrícia  
ESTADIAMENTO, GENÓTIPOS DE HPV E METILAÇÃO DO GENE WIF1 EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: ASSOCIAÇÕES COM O PROGNÓSTICO E SOBREVIVÊNCIA [manuscrito] / Keila Patrícia Almeida de Carvalho. - 2016.  
91 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos; co orientadora Dra. Vera Aparecida Saddi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. câncer do colo do útero. 2. estadiamento. 3. Papilomavírus humano. 4. metilação do DNA. I. Rabelo dos Santos, Sílvia Helena, orient. II. Título.

CDU 614



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE KEILA PATRÍCIA ALMEIDA DE CARVALHO** – Aos catorze dias do mês de outubro do ano de 2016 (14/10/2016), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, ROSANE RIBEIRO FIGUEIREDO ALVES e RUY DE SOUZA LINO JÚNIOR, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “ESTADIAMENTO, GENÓTIPOS DE HPV E METILAÇÃO DO GENE WIF1 EM CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: ASSOCIAÇÕES COM O PROGNÓSTICO E SOBREVIDA”, em nível de MESTRADO, área de concentração em **PATOLOGIA**, de autoria de **KEILA PATRÍCIA ALMEIDA DE CARVALHO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos  
Profa. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves  
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

**Aprovada / Reprovada**

aprovada  
APROVADA  
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PATOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 h 25 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Assinatura**

Profa. Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos (FF/UFG)  
Profa. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves (PUC/GO)  
Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior (IPTSP/UFG)  
Secretário da Pós-Graduação:

Silvia Helena Rabelo dos Santos  
Rosane Ribeiro Figueiredo Alves  
Ruy de Souza Lino Júnior  
José Clementino de Oliveira Neto

*À minha família: meus pais,  
irmãos e avós, por todo carinho,  
paciência e interesse.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Helena Rabelo dos Santos, pela acolhida calorosa, pela oportunidade de realizar esse trabalho e por confiar na minha competência.

A minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Aparecida Saddi, por disponibilizar seu espaço, tempo, experiência, ensinamentos, questionamentos e alunos para me ajudarem na execução desse projeto.

À Dr.<sup>a</sup> Luisa Lina Villa, por me receber e orientar tão bem, por me ceder seu espaço, tempo e funcionários para execução desse trabalho.

À Antonieta Mandreoli, por me ensinar os protocolos de extração de DNA, detecção e genotipagem de HPV, pela paciência e por incentivar meus estudos.

À Giana e Maria Cecília, por se dedicarem tanto e tão gratuitamente à execução dos meus experimentos e tornarem meus dias em São Paulo mais leves e prazerosos.

À Larisse Dalla, pela ajuda nas extrações de DNA, interesse e dedicação ao meu projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para execução e elaboração desse trabalho.

## RESUMO

**Introdução.** O tipo histológico mais comum do câncer do colo do útero é o carcinoma de células escamosas, seguido pelos adenocarcinomas endocervicais. O estadiamento tumoral é importante para avaliar o prognóstico. A infecção da cérvix por um dos genótipos oncogênicos de HPV, especialmente os HPV 16 e 18, é pré-requisito para o desenvolvimento do câncer invasor. Alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, são mecanismos conhecidos de carcinogênese. O gene *WIFI* é supressor tumoral e seu silenciamento por metilação auxilia na progressão neoplásica. **Objetivo.** O objetivo desse estudo foi avaliar o estadiamento, genótipos de HPV e a metilação do gene *WIFI* e testar a associação entre estas variáveis e a idade, o prognóstico e a sobrevida de mulheres com câncer do colo do útero. **Métodos.** Foram incluídos 95 casos obtidos no Hospital Araújo Jorge (Goiânia/GO) sendo 73 de carcinomas escamosos invasores e 22 de adenocarcinomas endocervicais invasores. O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio dos materiais de biópsia incluídos em parafina e a detecção e genotipagem de HPV foram realizadas utilizando-se o kit *INNO- LiPA HPV GENOTYPING EXTRA® (Innogenetics™)*. A análise de metilação do gene *WIFI* foi realizada através da técnica PCR específica para metilação (MSP). As associações estatísticas foram feitas com cálculo de *Odds Ratio* e a sobrevida foi calculada pelo método de Kaplan-Meier, sendo a comparação das médias de sobrevida e os fatores prognósticos analisada pelo teste *log-rank*. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados.** Houve associação estatisticamente significativa entre neoplasias diagnosticadas nos estágios III e IV e pior prognóstico (OR = 7,32). A sobrevida global em cinco anos foi de 79,1% e foi significativamente maior nos casos com estágios I e II ( $p = 0,001$ ). Mulheres na faixa etária entre 50 e 60 anos idade mostraram-se com maior chance de serem portadoras de câncer do colo do útero em estágios I e II (OR = 0,15). Contudo, considerando a média e mediana da idade das mulheres incluídas, aquelas com idade acima dos 51 anos tiveram mais chance de serem diagnosticadas com câncer em estágios III e IV (OR = 5,92). Não houve associação significativa entre tipo histológico, infecção por HPV ou metilação do gene *WIFI* e pior prognóstico ou menor sobrevida. **Conclusão.** Pior prognóstico e menor sobrevida das mulheres foram determinados pelo estadiamento tumoral em III e IV.

**Palavras-chave:** câncer do colo do útero, estadiamento, Papilomavírus humano, metilação do DNA.

## ABSTRACT

**Introduction.** Squamous cell carcinoma is the most common type of cervical cancer, followed by endocervical adenocarcinoma. Tumor staging is important to evaluate prognosis. Cervical infection by one of the oncogenic types of HPV, especially HPV 16 and 18 is a pre-requisite for developing invasive cancer. Epigenetics alterations, as DNA methylation, are well-known carcinogenic mechanisms. *WIFI* is a tumor suppressor gene which silencing by methylation helps in neoplastic progression.

**Objective.** The goal of this study was to evaluate staging, HPV genotypes and *WIFI* methylation in cervical cancer and to test association between these variables with age, prognosis and survival. **Methods.** It was included 95 cases obtained in Araujo Jorge Hospital (Goiânia/ GO): 73 of invasive squamous cell carcinoma and 22 of invasive endocervical adenocarcinoma. DNA was extracted from paraffin-embedded biopsies using phenol-chloroform. HPV detection and genotyping were conducted using the kit INNO- LiPA HPV GENOTYPING EXTRA® (Innogenetics™).

Methylation of *WIFI* gene was evaluated by methylation-specific PCR (MSP). Odds Ratio was used to calculate statistical association. The calculation of survival used the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare means of survival and prognostic factors. A value of  $p < 0.05$  was considered statically significant. **Results.** There was significant association between tumor stages III and IV and worse prognosis (OR = 7.32). The 5-year overall survival was 79.1% and it was significant higher in cases with tumor stages I and II ( $p = 0.001$ ). Women between 50 and 60 years had more chances having tumors in stages III and IV (OR = 0.15). Although, considering mean and median ages of women included, those over 51 years were more likely having tumor stages III and IV (OR = 5.92). No association was found between worse prognosis or lower survival and histological type, HPV infection and *WIFI* methylation. **Conclusion.** Worse prognosis and lower survival was determined by tumor stages III and IV.

**Key words:** cervical cancer, tumor staging, Human Papillomavirus, DNA methylation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1. Fisiopatologia</b> .....	11
<b>1.2. Prevenção</b> .....	11
<b>1.3. Tipos histológicos</b> .....	14
<b>1.4. Estadiamento</b> .....	15
<b>1.5. Prognóstico do câncer de colo do útero</b> .....	15
<b>1.6. Papilomavírus humano (HPV)</b> .....	16
<b>1.7. História natural da infecção por HPV</b> .....	18
<b>1.8. Mecanismos envolvidos na carcinogênese</b> .....	21
<b>1.9. Genótipos de HPV em câncer de colo do útero</b> .....	23
<b>1.10. Diagnóstico da infecção por HPV</b> .....	24
<b>1.11. Eventos epigenéticos que envolvem o câncer</b> .....	24
1.11.1. METILAÇÃO DO DNA .....	25
1.11.2. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT .....	26
1.11.3. GENE <i>WIFI</i> .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	28
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	28
<b>4. MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1. Desenho do estudo</b> .....	29
<b>4.2. Seleção de casos</b> .....	29
<b>4.3. Coleta de dados</b> .....	29
<b>4.4. Variáveis</b> .....	30

4.4.1. VARIÁVEL DEPENDENTE .....	30
4.4.2. VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....	30
<b>4.5. Diagnóstico histológico.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6. Análise molecular .....</b>	<b>32</b>
4.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
4.6.2. DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV .....	33
4.6.3. ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE <i>WIFI</i> .....	33
<b>4.7. Processamento e análise dos dados .....</b>	<b>34</b>
<b>4.8. Aspectos éticos.....</b>	<b>34</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
9.1 Anexo 1: parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	65
9.2. Anexo 2: manuscrito a ser submetido .....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS, FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do genoma do HPV .....	17
<b>Figura 2.</b> Árvore filogenética do HPV .....	18
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da progressão do câncer do colo do útero mediada pelo HPV.....	19
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do ciclo de vida do HPV .....	20
<b>Figura 5.</b> Regulação do ciclo de vida do HPV .....	21
<b>Figura 6.</b> Desregulação do ciclo de vida do HPV – infecção não produtiva.....	22
<b>Figura 7.</b> Estrutura de citosina mostrando sua metilação e o efeito dessa mudança a nível genômico .....	255
<b>Figura 8.</b> Fluxograma de obtenção do total de casos estudados.....	30
<b>Quadro 1.</b> Estadiamento da FIGO (2009) para o câncer de colo do útero .....	31
<b>Quadro 2.</b> Sequências de primers utilizados na MSP.....	34
<b>Tabela 1.</b> Características sociodemográficas e comportamentais da população em estudo.....	35
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos estágios da neoplasia cervical de acordo com o tipo histológico .....	36
<b>Figura 9.</b> Prevalência dos genótipos de HPV nas 92 amostras positivas para infecção viral.....	36
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos genótipos de HPV de acordo com o tipo histológico e o estadiamento da neoplasia .....	38
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos casos positivos e negativos para metilação do gene <i>WIFI</i> de acordo com a origem e estadiamento da neoplasia.....	39
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos casos de acordo com o tipo histológico, estadiamento, infecção por HPV e metilação do gene <i>WIFI</i> e evolução até a data do último seguimento.....	40
<b>Tabela 5.</b> Continuação .....	41
<b>Tabela 6.</b> Associação entre o prognóstico e estadiamento tumoral, tipo histológico da neoplasia, infecção por HPV e metilação do gene <i>WIFI</i> .....	422
<b>Tabela 7.</b> Associação entre estadiamento da neoplasia, genótipos de HPV e metilação do gene <i>WIFI</i> e faixa etária.....	43

**Tabela 8.** Associação entre estadiamento da neoplasia, genótipos de HPV e metilação do gene *WIF1* e idade ..... 44

**Figura 10.** Sobrevida global em cinco anos dos 95 casos analisados e de acordo com o estadiamento da neoplasia, idade, tipo histológico, genótipos de HPV e metilação do gene *WIF1* ..... 45

## **1. INTRODUÇÃO**

O câncer de colo do útero é considerado um importante problema de saúde pública. É raro em mulheres com idade até os 30 anos e tem seu pico de incidência na faixa etária de 45 a 50 anos, sendo que a mortalidade aumenta progressivamente a partir da quarta década de vida (INCA, 2016).

Para o ano de 2012, estimou-se a ocorrência de 527 mil novos casos de câncer do colo do útero no mundo, configurando-se como o terceiro mais comumente diagnosticado e a quarta causa de óbitos em mulheres e representando 9% do total de novos casos e 8% no total das mortes por câncer entre as mulheres (JEMAL et al., 2011; AGGARWAL, 2014; INCA, 2016). Nesse mesmo ano, foi responsável pelo óbito de 265 mil mulheres, sendo que 87% deles ocorreram em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011; INCA, 2016). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016 foi de 16.340 novos casos de câncer do colo do útero (INCA, 2016).

### **1.1. Fisiopatologia**

O câncer do colo do útero é uma doença cuja evolução é habitualmente lenta, apresentando fases pré-invasoras que são caracterizadas por lesões conhecidas como neoplasia intraepiteliais cervicais. O período de evolução de uma lesão inicial para a forma invasiva, na maioria dos casos, é de 10 a 30 anos (VINK et al.; 2013; STEENBERGEN et al., 2014). As lesões precursoras são caracterizadas pela perda gradual de funções celulares básicas, como divisão e diferenciação. As células anormais perdem gradualmente as funções de controle, de crescimento normal básico e não se diferenciam adequadamente. Como consequência, há proliferação celular desordenada. Se a anormalidade progride, as células perdem gradativamente sua capacidade de diferenciação até que toda a espessura do epitélio seja composta por células indiferenciadas (DOORBAR et al., 2012; STEENBERGEN et al., 2014).

A infecção da cérvix uterina por um dos genótipos oncogênicos de Papilomavírus humano (HPV) é pré-requisito para o desenvolvimento de câncer invasor (WALBOOMERS et al., 1999; HOORY et al., 2008; de SANJOSE et al., 2010). Todavia, a taxa das lesões que progridem para câncer é muito baixa quando comparada à prevalência de infecção. A maioria das infecções pelo HPV é transitória, regredindo espontaneamente. Nas mulheres nas quais a infecção persiste, as alterações causadas

pelo vírus podem progredir a lesões intraepiteliais, que são detectáveis no exame citológico, e podem evoluir para carcinoma invasor. Assim, há uma maior prevalência de infecção por HPV naquelas mulheres cujos esfregaços citológicos apresentam atipias celulares (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; RIBEIRO et al., 2011; TOMMASINO, 2014).

Alguns cofatores, como tabagismo, obesidade, uso prolongado de contraceptivos hormonais, estado imunológico do hospedeiro e coinfeções com outros agentes sexualmente transmissíveis, podem contribuir para a persistência da infecção pelo HPV, aumentando, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento do câncer de colo do útero (MOSCICKI, 2011; McGRAW; FERRANTE, 2014; RIBEIRO et al., 2015). Existem ainda outros fatores de risco comportamentais e demográficos que contribuem para o aumento do risco relativo de se adquirir a infecção por HPV e, conseqüentemente, desenvolver lesões precursoras e o câncer do colo do útero: baixo nível de escolaridade, idade de início da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, multiparidade e falha na rotina do exame citológico (AGGARWAL, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

## **1.2. Prevenção**

Atualmente, existem duas vacinas profiláticas contra o HPV no mercado: Cervarix (Glaxo Smith Kline, Middlesex, Bélgica) e Gardasil (Merck Sharp & Dohme, Hertfordshire, EUA) (FISCHER et al., 2016). Ambas foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), são eficazes e seguras, constituídas pela proteína L1 do capsídeo viral e produzidas pela tecnologia de DNA recombinante. A Cervarix é bivalente, oferecendo proteção contra a infecção pelos HPV 16 e 18 e a Gardasil, quadrivalente, que protege contra dois genótipos de baixo risco oncogênico HPV 6 e 11, além dos HPV 16 e 18 (DOCHEZ et al., 2014; FISCHER et al., 2016).

As duas vacinas são altamente imunogênicas. A melhor resposta imune foi observada em mulheres com idade entre 10 e 15 anos, e a melhor eficácia, naquelas que ainda não iniciaram a atividade sexual (McGRAW; FERRANTE, 2014). Em razão de semelhanças filogenéticas, a vacina bivalente apresentou proteção cruzada contra os HPV 31, 33, 45 e 51 e a quadrivalente, contra HPV 31 principalmente (MESHER et al., 2015; FISCHER et al., 2016).

Os resultados obtidos até o momento são promissores. Nos países cuja cobertura vacinal foi superior a 50% houve redução significativa de 68% da infecção por HPV 16 e 18 e pelos HPV 31, 33 e 45, indicando proteção cruzada. Em lugares onde a cobertura

vacinal foi inferior a 50% a redução foi significativa para a infecção por HPV 16 e 18 em mulheres com menos de 20 anos, mas sem evidências de proteção cruzada (DROLET et al., 2015).

No Brasil, a imunização contra o HPV teve início em 2014 e o público-alvo foram meninas de 11 a 13 anos de idade. A vacina administrada foi a quadrivalente e a primeira dose ultrapassou a meta de 80% de cobertura, graças à parceria com escolas públicas e privadas. Na segunda dose, aplicada seis meses depois da primeira, essa cobertura caiu para cerca de 50% do número estimado. Em 2015, expandiu-se a faixa etária para 9 a 11 anos. O esquema adotado foi o chamado estendido, no qual a primeira e a segunda dose são aplicadas com intervalo de seis meses e terceira após cinco anos da segunda dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A citologia convencional é o método mais usado no mundo na prevenção do câncer do colo do útero e considerado eficiente, uma vez que tem a habilidade de identificar lesões precursoras enquanto ainda são passíveis de tratamento (AGGARWAL, 2014; COSTA et al., 2015). Entretanto, a redução na incidência dos casos de câncer com o uso desse teste depende da frequência com que ele é realizado na mesma mulher e da parcela populacional que o programa de rastreio consegue atingir. Países com cobertura superior a 50% da população-alvo e com exame citopatológico realizado a cada 3 a 5 anos apresentam taxas inferiores a três mortes por 100.000 mulheres por ano e, para aqueles com cobertura superior a 70%, esta taxa é igual ou menor a duas mortes por 100.000 mulheres por ano (INCA, 2016).

O exame citopatológico tem por objetivo analisar células esfoliadas da ecto e endocérvice uterina colhidas com espátula de Ayre e citoescova, respectivamente. O esfregaço é fixado e corado de acordo com a técnica de Papanicolaou e analisado seguindo-se o Sistema de Bethesda (AGGARWAL, 2014). A sensibilidade desse teste pode variar de 11% a 99% e a especificidade, de 14% a 100%. Os resultados falso-negativos vão de 1% a 62% e são causados por erros na coleta da amostra, no escrutínio dos esfregaços e na interpretação do diagnóstico. A grande variabilidade do desempenho diagnóstico é sua grande fragilidade (DISCACCIATI; BARBOZA; ZEFERINO, 2014; COSTA et al., 2015).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) realiza mais de 10 milhões de exames citopatológicos por ano, número suficiente para garantir cobertura de 70% a 80%. Contudo, o câncer de colo do útero continua sendo importante problema de saúde e causa de mortalidade. O exame de rastreamento, por si só, não é suficiente para garantir

a redução da mortalidade. É necessário que as mulheres cujo resultado é alterado recebam o tratamento adequado. Há evidências de que um percentual significativo de mulheres encaminhadas para avaliação colposcópica não a faz, e o SUS não é eficiente o bastante para rastreá-las (ZEFERINO, 2008).

A recomendação da diretriz brasileira é que se inicie o rastreamento para o câncer do colo do útero aos 25 anos de idade – para mulheres que já iniciaram a atividade sexual – e se encerre aos 64 anos, desde que as mulheres sem história prévia de doença pré-invasora tenham dois exames citopatológicos negativos consecutivos nos últimos cinco anos. Os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual e, se ambos os resultados forem negativos, os próximos devem ser realizados a cada três anos (INCA, 2016).

### **1.3. Tipos histológicos**

As neoplasias do colo uterino são classificadas histologicamente em três grupos principais: carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas endocervicais e outros tumores epiteliais (INCA, 2016). O tipo histológico mais comum do câncer do colo do útero é o carcinoma de células escamosas, representando 75% a 90% dos casos e dividido em queratinizado e não queratinizado. Este tipo pode ser subclassificado em carcinoma verrucoso, condilomatoso, papilar e carcinoma semelhante a linfoepitelioma (SCHLICHTE; GUIDRY, 2015; INCA, 2016;).

Os adenocarcinomas endocervicais ocorrem em 11% e 25% dos casos e são subclassificados em mucinoso, endometriode, seroso, adenocarcinoma de células claras e viloglandular bem diferenciado (FUJIWARA et al., 2014; NOWAKOWSKI et al., 2016). Os carcinomas adenoescamosos, classificados como “outros tumores epiteliais”, representam 2% a 3% dos casos e são constituídos histologicamente por células escamosas e glandulares (JHINGRAN et al., 2003; INCA, 2016).

Uma meta-análise conduzida por de Sanjose et al. (2010), que analisou 10.575 amostras de três tipos histológicos de câncer cervical invasor (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma endocervical e carcinoma adenoescamoso) de 38 países, relatou que os tipos de HPV mais prevalentes foram HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58. Os HPV 16, 18 e 45 foram os mais prevalentes nos três tipos neoplásicos, sendo os HPV 18 e 45 mais prevalentes em casos de adenocarcinoma endocervical do que no carcinoma de células escamosas.

#### **1.4. Estadiamento**

O estadiamento de qualquer tipo de câncer é importante para avaliar o prognóstico, pois as taxas de sobrevida são diferentes quando a neoplasia está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros. Sendo assim, estadiar uma neoplasia maligna significa avaliar seu grau de disseminação (INCA, 2016).

O estadiamento mais amplamente utilizado foi estabelecido pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e *International Union Cancer* (IUCC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos (FIGO, 2009; INCA, 2016).

Esse sistema baseia-se na extensão anatômica, considerando-se as características do tumor primário (T), o comprometimento linfonodal da região do órgão afetado (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Esses parâmetros recebem graduações numéricas: T0 a T4, N0 a N3 e M0 e M1. Quando as categorias T, M e N são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios que variam de I a IV e que podem ser subdivididos em A e B, para expressar o nível de evolução da neoplasia (INCA, 2016).

#### **1.5. Prognóstico do câncer de colo do útero**

O prognóstico define-se como a chance de cura da doença e relaciona-se com vários fatores, como o tipo histológico, estadiamento, comprometimento dos linfonodos pélvicos e envolvimento de paramétrio e vagina (XIE et al., 2012; INCA, 2016). Fatores prognósticos podem ser definidos como parâmetros mensuráveis no momento do diagnóstico que servem para prever a sobrevida. Eles compreendem diversas condições de risco, que vão desde a idade da paciente no momento do diagnóstico até complexas alterações genéticas, como a presença da mutação em genes supressores de tumor (ABREU; KOIFMAN, 2002).

A compreensão dos fatores prognósticos é de grande importância para determinar os programas terapêuticos e pode ajudar a reduzir a mortalidade. A avaliação prognóstica possibilita a escolha e aplicação de tratamento individualizado, com efetividade e intensidade adequadas, baseado na presença ou não dos fatores prognósticos associados ao câncer do colo do útero. Com isso, a eficácia do tratamento pode ser otimizada, a taxa de sobrevida, aumentada, e a qualidade de vida, melhorada (ABREU; KOIFMAN, 2002; XIE et al., 2012).

A relevância do tipo histológico do câncer do colo do útero como fator prognóstico independente é controversa. Há estudos que ressaltam ser esse um importante fator prognóstico, pois observou-se menor sobrevida nas mulheres cujas neoplasias eram de origem glandular (VINH-HUNG et al., 2007; SILVA-FILHO, 2009; INTARAPHET et al., 2013). Outros relataram não haver diferenças significativas na sobrevida entre mulheres com carcinomas escamosos e adenocarcinomas endocervicais, o que pode ser explicado pela falta de padronização e baixa reprodutibilidade intra e interobservador do diagnóstico histopatológico (HELLMAN; HELLSTROM; PETTERSSON, 2014; NOWAKOWSKI et al., 2016).

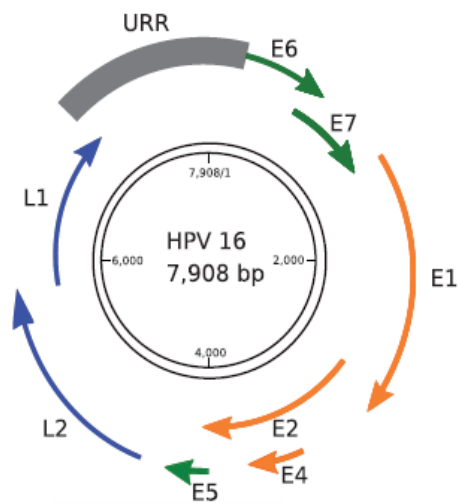
A sobrevida em cinco anos encontra-se em torno dos 75%, sendo maior nos casos com estágios I e II e sem comprometimento dos linfonodos pélvicos (XIE et al., 2012). Estudos conduzidos no Brasil mostraram sobrevida de 93,5% e 100% quando o câncer do colo do útero foi detectado nos estágios I e II. Isso indica que a doença, quando tratada na fase inicial, pode ser completamente curada e elevar potencialmente a taxa de sobrevida global (NAKAGAWA et al., 2011).

### **1.6. Papilomavírus humano (HPV)**

O HPV é classificado na família *Papillomaviridae* e é um vírus não envelopado, de tamanho aproximado de 55nm, simetria icosaédrica com 72 capsômeros e DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8 mil pares de bases. O genoma viral está organizado em três grandes regiões: LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*) – a região reguladora da transcrição; região E (*Early*) – composta por genes expressos nas fases iniciais da infecção; e região L (*Late*), que compreende genes expressos tardiamente (BRAVO; FELEZ-SANCHEZ, 2015) (figura 1).

A região E codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. E1 está envolvida na replicação viral, E2 na transcrição e replicação, E4 na maturação viral e alteração da matriz intracelular, E5 na proliferação celular e E6 e E7 são as oncoproteínas responsáveis pela transformação celular e carcinogênese. A região L codifica as proteínas L1 e L2, componentes do capsídeo viral (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; GHITTONI et al., 2015)

**Figura 1.** Representação esquemática do genoma do HPV

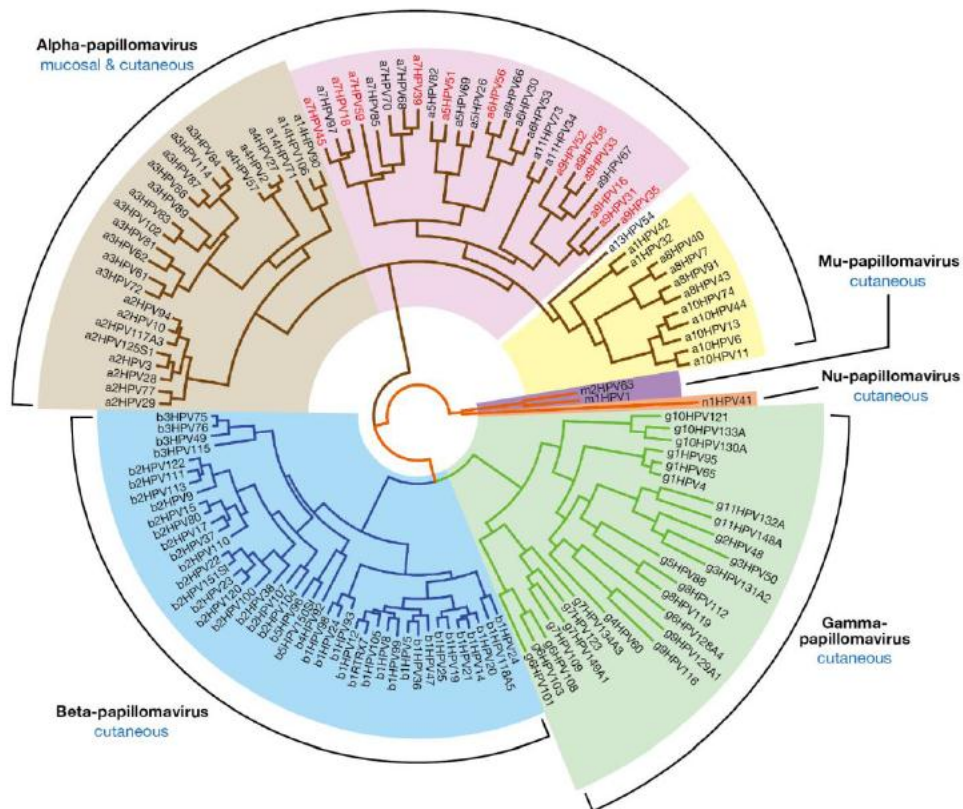


Fonte: adaptado de Bravo; Félez-Sánchez, 2015.

Mais de 200 genótipos de HPV já foram identificados e cerca de 40 desses têm tropismo pelo trato genital feminino. Os vírus que infectam humanos foram classificados filogeneticamente em cinco gêneros (*Alpha*, *Beta*, *Gama*, *Mu* e *Nu*), de acordo com a diversidade genômica da sequência completa do gene codificante da proteína L1 – muito conservada no HPV (figura 2) (DOORBAR et al., 2012; BELLO et al., 2015). As diversas espécies que infectam o trato genital feminino são classificadas filogeneticamente no gênero *Alphapapillomavirus* (BERNARD et al., 2010; DOORBAR et al., 2012; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Baseado em sua associação com câncer do colo do útero, os vírus do gênero *Alphapapillomavirus* são divididos em 18 genótipos de alto risco oncogênico, sendo 15 comprovadamente de alto risco oncogênico (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) e três considerados como de provável alto risco oncogênico (HPV 26, 53 e 66); e 11 de baixo risco oncogênico, incluindo os HPV 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81 e 83 (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BERNARD et al., 2010; DOORBAR et al., 2012; TOMMASINO, 2014). Os HPV 16, 18, 31 e 33 são responsáveis por 90% dos casos de câncer de colo do útero. Desses, o HPV 16 é o mais prevalente, detectado em mais de 50% dos casos (CHEN et al., 2014).

**Figura 2.** Árvore filogenética do HPV



Fonte: adaptado de Egawa et al., 2015.

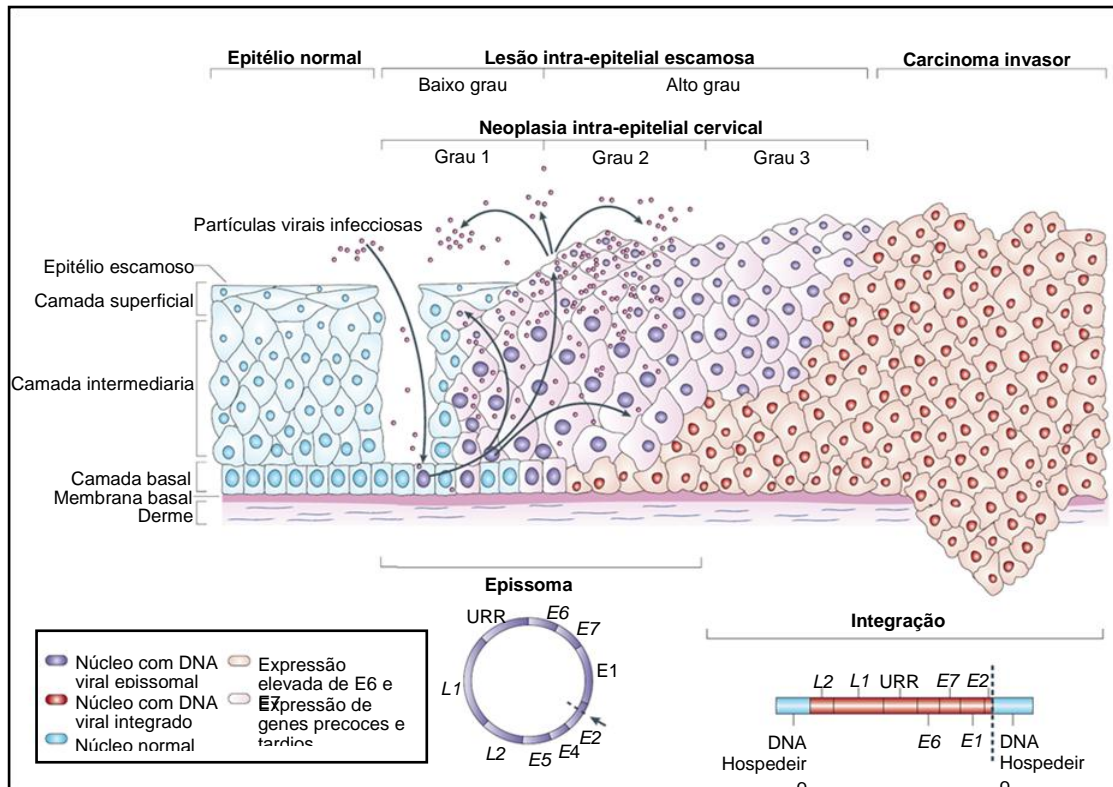
### 1.7. História natural da infecção por HPV

A infecção por HPV é a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis. Sua maior prevalência ocorre em mulheres com idade entre 15 e 25 anos. Com o aumento da idade, reduz-se a taxa de infecção pelo vírus em razão de uma combinação de fatores, como redução da exposição ao HPV, natureza autolimitada da maioria das infecções e resistência imunológica a reinfecção (HOORY et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015).

O vírus penetra em regiões de microtraumatismos e alcança as células da camada basal do epitélio do colo uterino, sendo seu alvo os queratinócitos indiferenciados dessa camada. O ciclo de vida do HPV acompanha a diferenciação das células epiteliais da cérvix uterina (STANLEY, 2012; TOMMASINO, 2014). A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre através das proteínas do capsídeo viral, L1 e L2, que se ligam de forma específica a receptores presentes nas células basais (figura 3). No interior da célula, o genoma é carregado para o núcleo, onde o maquinário de replicação do DNA da

célula hospedeira passa a ser usado pelo vírus para replicar seu próprio genoma (DOORBAR et al., 2012).

**Figura 3.** Representação esquemática da progressão do câncer do colo do útero mediada pelo HPV



Fonte: adaptado de WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007.

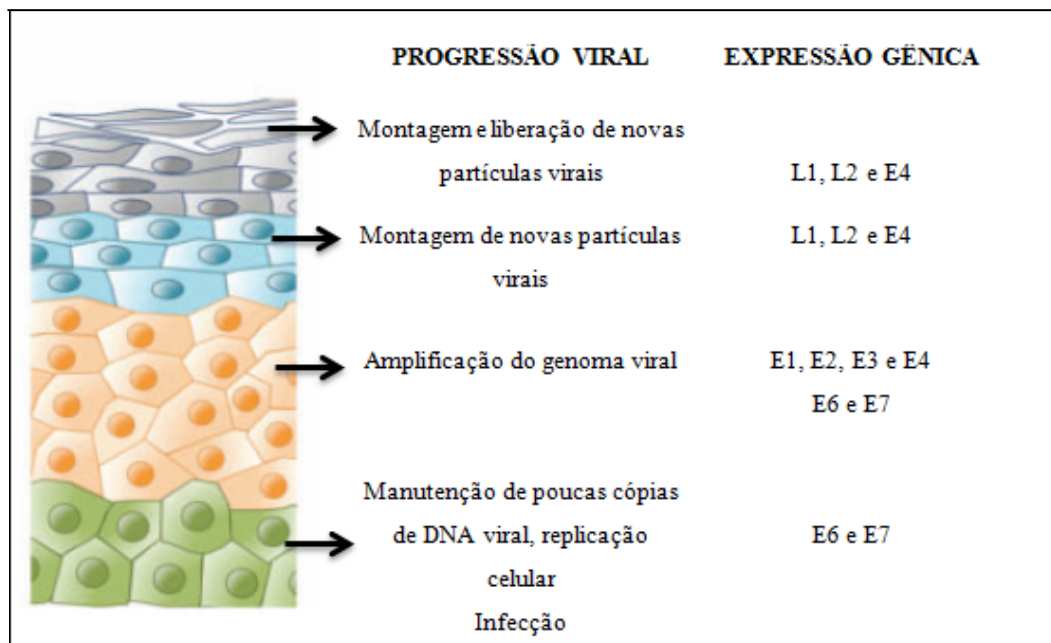
O DNA do HPV pode ser encontrado em células epiteliais na forma epissomal, integrada ou ambas as formas. Em seu ciclo de replicação normal, conhecido como infecção produtiva, o genoma viral se apresenta na forma epissomal (circular) em um número que pode variar de 50 a 100 cópias por célula. Nessa forma, o DNA do vírus se mantém íntegro e a expressão dos genes que codificam as proteínas E6 e E7 é rigorosamente regulada pelo produto do gene E2, mantendo os altos níveis destas proteínas restritos à camada parabasal (BRAVO; FELEZ-SANCHEZ, 2015; EGAWA et al., 2015) (figuras 4 e 5).

Os produtos dos genes E6 e E7, expressos no início do processo de replicação, fazem com que a célula entre na fase S (síntese) do ciclo celular, ativando o maquinário de síntese do DNA, o qual é necessário para a replicação viral. À medida que a célula hospedeira se diferencia, a expressão das proteínas E6 e E7 é substituída pela expressão de E1, E2, E4 e E5, o que resulta no aumento do número de cópias virais para milhares. Mais tardiamente, em células escamosas maduras, são expressas as proteínas L1 e L2,

responsáveis pela montagem e empacotamento virais (figuras 4 e 5). A produção final de partículas virais infecciosas depende do processo de maturação da célula epitelial. A proteína E4 pode auxiliar na liberação dessas partículas, uma vez que se liga ao citoesqueleto celular e rompe sua estrutura. Todavia, esse processo geralmente ocorre com a descamação normal destas células, caracterizando um ciclo não lítico e com pouca ou nenhuma resposta inflamatória (DOORBAR et al., 2012; EGAWA et al., 2015), (figuras 3, 4 e 5).

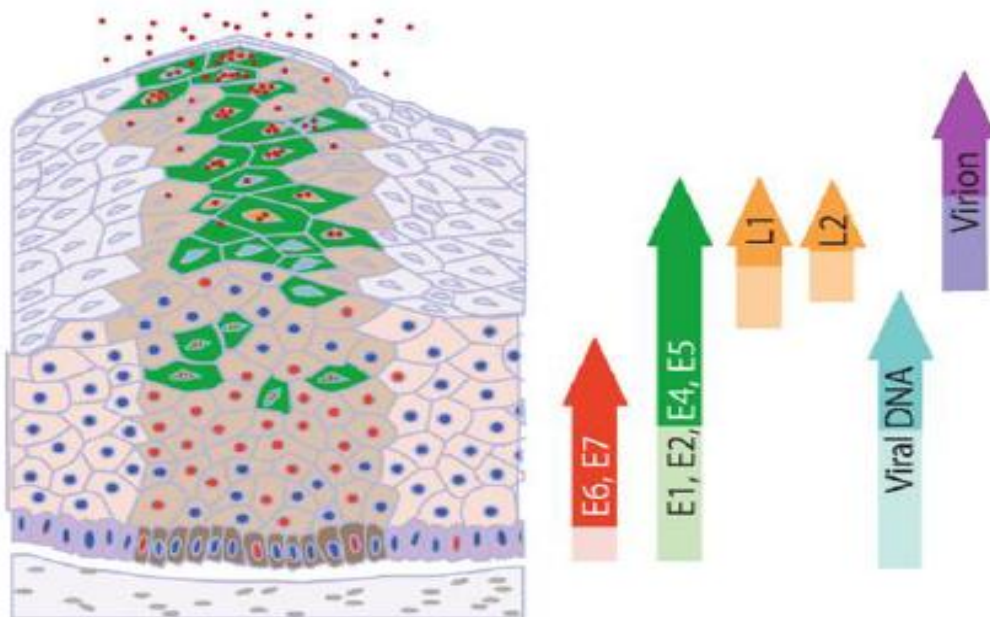
Estima-se que mais de 80% das mulheres sexualmente ativas estão infectadas ou foram expostas ao HPV em algum momento de suas vidas. Na maioria dos casos, a infecção é assintomática e resolvida pela imunidade celular em 6 a 12 meses, não persistindo o suficiente para provocar lesões celulares (TOMMASINO, 2014). Discacciati et al. (2011) conduziram um estudo com mulheres brasileiras entre 14 e 74 anos de idade no qual a taxa de regressão de lesões de baixo grau foi de 74% em 12 meses. A ineficácia da resposta imune celular aliada a genótipos virais de alto risco oncogênico – especialmente os HPV 16 e 18, capazes de evadir do reconhecimento pelo sistema imunológico – é responsável por falha na regressão espontânea em 10 a 20% das mulheres infectadas (DOORBAR et al., 2012; GHITTONI et al., 2015).

**Figura 4.** Representação esquemática do ciclo de vida do HPV



Fonte: adaptado de Bravo; Félez-Sánchez, 2015.

**Figura 5.** Regulação do ciclo de vida do HPV

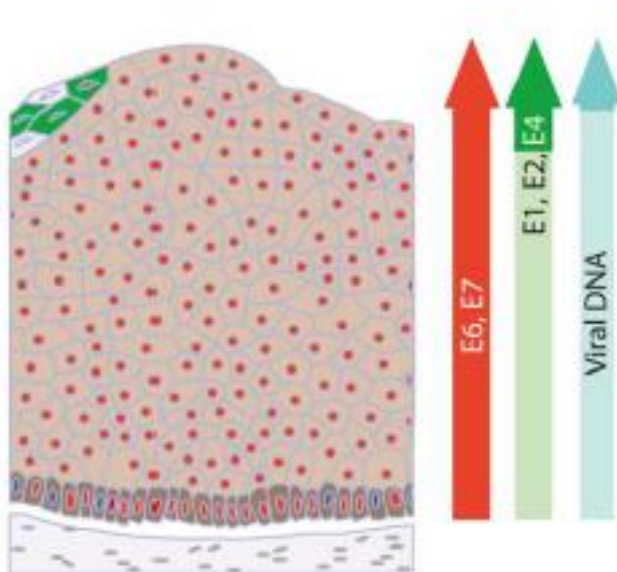


Fonte: adaptado de Doorbar et al., 2012.

### 1.8. Mecanismos envolvidos na carcinogênese

A progressão da infecção pelo HPV para o câncer do colo do útero ocorre apenas em um pequeno percentual de mulheres infectadas. A persistência é considerada o fator determinante na progressão de lesões precursoras para o carcinoma invasor (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BODILY; LAIMINS, 2011). Os genótipos de alto risco oncogênico, especialmente o HPV 16, podem persistir por mais tempo, aumentando o risco de desenvolvimento do câncer do colo do útero (ZUR HAUSEN, 2002; CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010). Nesses casos, a presença contínua do genoma viral no interior da célula hospedeira pode interferir no controle do ciclo celular, permitindo a replicação do DNA mesmo em situações onde esse encontra-se danificado. Não ocorre a expressão dos genes necessários à montagem de novas partículas virais, estabelecendo-se uma infecção não produtiva (BODILY; LAIMINS, 2011; EGAWA et al., 2015) (figura 6).

**Figura 6.** Desregulação do ciclo de vida do HPV – infecção não produtiva



Fonte: adaptado de Doorbar et al., 2012.

Para que ocorra a progressão neoplásica, além da infecção persistente, é necessária a expressão contínua de alguns genes virais (figura 6). As atividades das oncoproteínas E6 e E7 podem explicar parte da probabilidade para progressão (HOORY et al., 2008; TOMMASINO, 2014). Ambas inibem proteínas humanas que controlam o ciclo celular, permitindo que as células infectadas sejam capazes de evadir-se dos mecanismos regulatórios de proliferação, o que as torna imortais (BELLO et al., 2015).

E6 induz a degradação proteossômica da proteína supressora de tumor p53, um fator de transcrição ativado na resposta ao estresse celular ou a danos no DNA e regulada positivamente por genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose. A ligação de E6 a p53 leva à ubiquitinação desta e sua subsequente degradação. Como a função de p53 é resguardar a integridade do genoma, induzindo parada do ciclo celular ou apoptose, células que expressam E6 têm instabilidade cromossômica, o que aumenta a chance de se tornarem malignas (WHITE et al., 2012; TOMMASINO, 2014).

E7 liga-se à proteína celular pRb, promovendo sua degradação e a progressão da célula hospedeira para a fase S do ciclo celular. pRb tem a função de controlar a proliferação celular e encontra-se hipofosforilada na fase G1 (WHITE et al., 2012; TOMMASINO, 2014). Na presença de sinais bioquímicos que induzam a célula a se dividir, pRb é fosforilada pelo complexo ciclinaD/CDK4/6, resultando na liberação do fator de transcrição E2F, necessário para a passagem à fase S. Esse processo natural é mimetizado por E7, uma vez que sua interação com pRb inibe a ação regulatória dessa e

promove a ativação de E2F e a consequente proliferação celular descontrolada, com o intuito de permitir a replicação do genoma viral (CHEN et al., 2014; TOMMASINO, 2014).

A integração do genoma viral ao genoma humano é considerado um importante passo na progressão de lesões precursoras para carcinoma invasor, pois observa-se maior prevalência de formas integradas em lesões mais severas. Para que esse processo ocorra, há a quebra do DNA do HPV na região próxima aos genes E6 e E7, levando à ruptura do gene E2 e sua inativação. E2 regula E6 e E7 e sua perda resulta em aumento da expressão desses genes, levando a proliferação celular exacerbada, inibição da apoptose e instabilidade cromossômica, ou seja, imortalização das células (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007; BELLO et al., 2015). Apesar de ser importante, a integração não é essencial para a progressão neoplásica. Tabagismo, comportamento sexual, uso de contraceptivos orais, estado imunológico e predisposição genética foram relatados em estudos epidemiológicos como fatores de risco para progressão das lesões precursoras para carcinoma invasor (GHITTONI et al., 2015).

### **1.9. Genótipos de HPV em câncer de colo do útero**

Os dois genótipos de HPV predominantes nas neoplasias cervicais são os HPV 16 e 18. Estudos indicam que o HPV 16 é o mais prevalente em carcinomas escamosos, sendo observado em 50% a 60% dos casos, enquanto o HPV 18 ocorre em 10% a 20%. Entretanto, em se tratando de adenocarcinomas endocervicais, a situação se inverte, tendo o HPV18 uma prevalência de 40% a 60% e o HPV 16, de 31% a 53% (de SANJOSE et al., 2010; LI et al., 2011; INCA, 2016).

Um estudo transversal retrospectivo mundial mostrou que os HPV 16, 18 e 45 foram os três genótipos mais comuns em cada grupo histológico (carcinoma de células escamosas, adenocarcinomas endocervicais e carcinomas adenoescamosos, respectivamente). Esses foram detectados em 75% (6.223 de 8.252) casos de carcinomas escamosos e 94% (443 de 470) casos de adenocarcinomas endocervicais (de SANJOSE et al., 2010).

Vários estudos investigaram a distribuição genotípica do HPV em casos de câncer invasivo no Brasil. Todos demonstraram que os HPV 16 e 18 são os mais prevalentes, seguidos pelos HPV 31 e 33, sendo as Regiões Nordeste e Centro-Oeste as exceções. Naquela, o terceiro e quarto genótipos mais prevalentes são os HPV 58 e 45, e nesta o segundo lugar é ocupado pelo HPV 33 (ELUF-NETO et al., 1994; RABELO-SANTOS

et al., 2003; FERNANDES et al., 2010). de Oliveira et al. (2013), ao analisarem mulheres atendidas em dois grandes hospitais de referência no tratamento do câncer no estado de São Paulo, obtiveram dados que corroboram a distribuição genotípica mundial em carcinomas invasivos, sendo o HPV 16 o mais prevalente, seguido pelos HPV 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58.

### **1.10. Diagnóstico da infecção por HPV**

A infecção pelo HPV pode ser diagnosticada por testes moleculares, que são tanto sensíveis quanto específicos, pois detectam o DNA viral mesmo em baixas quantidades e distinguem os genótipos entre si. Estudos sugerem o uso desses testes como ferramenta primária de rastreio do câncer, uma vez que têm mostrado maior sensibilidade e valor preditivo negativo para lesões precursoras quando comparados aos métodos morfológicos (GOODMAN, 2015).

Um teste muito utilizado em estudos epidemiológicos é a hibridização com sondas, tal como *LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING® (Roche Molecular Diagnostics™)* e *INNO-LIPA HPV GENOTYPING® (Innogenetics™)*. O primeiro consegue diferenciar 37 genótipos de HPV, sendo 19 de alto risco oncogênico e 18 de baixo risco; enquanto o segundo diferencia 28 genótipos, sendo 18 de alto e provável alto risco e 10 de baixo risco oncogênico. A limitação de todos os testes que detectam DNA do HPV é o baixo valor preditivo positivo para as lesões precursoras, ou seja, não são capazes de diferenciar, entre as células infectadas, as que têm lesão daquelas inalteradas (GHITTONI et al., 2015).

### **1.11. Eventos epigenéticos que envolvem o câncer**

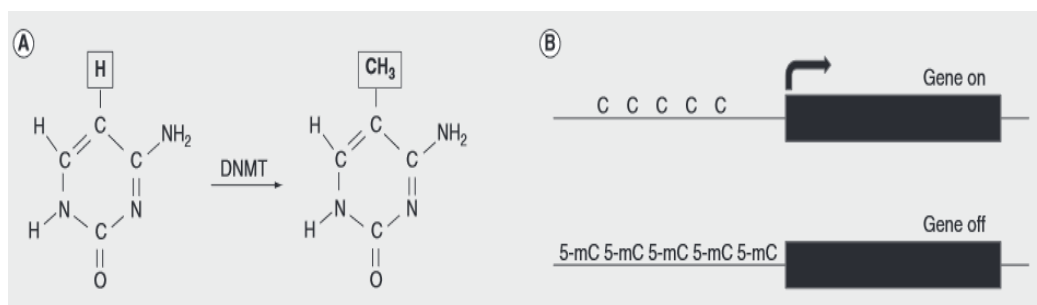
O termo epigenética refere-se a mudanças hereditárias na expressão gênica, causadas por mecanismos de regulação. Especificamente, os processos epigenéticos incluem metilação do DNA, remodelação da cromatina, modificação das histonas, e regulação por microRNA (SAAVEDRA; BREBI; ROA, 2012).

Essas alterações, em conjunto ou individualmente, permitem estabelecer perfis de metilação, mapas de modificação de histonas, e o perfil de expressão gênica característico do câncer cervical, tornando-se ferramentas úteis para o rastreamento, detecção precoce ou como marcadores prognósticos do câncer do colo do útero (SAAVEDRA; BREBI; ROA, 2012).

### 1.11.1. METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA consiste na transferência de grupos metil a algumas das bases citosinas (C) do DNA situadas prévia e contiguamente a uma guanina (G) pela ação da enzima DNA metiltransferase (DNMT) (figura 7). Os dinucleotídeos CG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG. Em condições normais, a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos estão metilados, ao contrário da maioria das ilhas CpG, frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes constitutivos. Por definição, as ilhas CpG são regiões do DNA com mais de 200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (STEENBERGEN et al., 2014). A metilação exacerbada das ilhas CpG pode remodelar a cromatina e, conseqüentemente, impedir a ligação entre a molécula de DNA e fatores de transcrição. Assim, alguns genes podem ter sua expressão diminuída ou ser silenciados (LIN et al., 2009; PASKA; HUDLER, 2015).

**Figura 7.** Estrutura de citosina mostrando sua metilação e o efeito dessa mudança a nível genômico



(A): à esquerda, tem-se a estrutura da citosina e à direita, a 5-metilcitosina. A metilação dessa base nitrogenada se dá no carbono 5 do anel aromático, sob ação da DNA metil transferase (DNMT). (B): a hipermetilação de região promotora leva à inativação da transcrição gênica. Muitos supressores tumorais são controlados por metilação e, se inativados, a célula é bioquimicamente direcionada à apoptose ou carcinogênese. Fonte: adaptado de Lorincz, 2014.

No funcionamento normal das células, modificações epigenéticas no DNA são processos frequentes na regulação da estrutura da cromatina e no controle da expressão gênica em vários tipos celulares e estágios de desenvolvimento (DELMAS et al., 2011). A desregulação de um ou mais desses mecanismos ocorre, geralmente, em diversas patologias. No câncer, a reorganização da cromatina como consequência da metilação

do DNA resulta em silenciamento de genes supressores de tumor, fato considerado uma etiologia alternativa à carcinogênese (PASKA; HUDLER, 2015).

A metilação exacerbada de regiões promotoras é um importante mecanismo para perda de função gênica em neoplasias. Como esse processo se dá no início da carcinogênese e normalmente está presente nas lesões precursoras de vários tipos de câncer, a metilação do DNA pode ser um potencial biomarcador para o diagnóstico precoce (LORINCZ, 2014).

### 1.11.2. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT

A via de sinalização Wnt compreende uma família de proteínas extracelulares que inclui ampla variedade de fatores de crescimento responsáveis pela manutenção de alguns tipos de células tronco embrionárias e adultas, pela interação intercelular, proliferação, diferenciação e migração celular (LIN et al., 2009; DELMAS et al., 2011; WEND et al., 2013). Essas proteínas se ligam a receptores transmembrana da família Frizzled (Fz), o que gera desfosforilação e supressão da degradação da  $\beta$ -catenina, permitindo sua translocação para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição da família fator de células T/fator de crescimento linfocitário (TCF/LEF), estimulando a transcrição de genes alvo, como o da ciclina D1, por exemplo. Além disso, essa interação é capaz de modular a estrutura da cromatina (TRIFA et al., 2013; WEND et al., 2013).

Essa via de sinalização tem forte associação com a carcinogênese, pois a expressão acentuada de suas proteínas está associada à inibição da apoptose e proliferação excessiva em células tumorais de vários tipos de câncer, como o do colo do útero, colorretal, nasofaríngeo, de cabeça e pescoço, de pulmão, leucemia e melanoma (LIN et al., 2009; TRIFA et al., 2013).

Um dos mecanismos de controle da via Wnt/  $\beta$ -catenina é a secreção de inibidores extracelulares, como o fator de inibição de Wnt 1 (*WIF1*).

### 1.11.3. GENE *WIF1*

O gene *WIF1* está localizado em 12q14 e codifica uma proteína antagonista da via Wnt, que age se ligando às proteínas dessa via e impedindo-as de interagir com os receptores transmembrana Fz (TRIFA et al., 2013). Sendo essa via responsável pela proliferação, diferenciação e polaridade celular, a inibição de seus antagonistas, tais

como o gene *WIFI*, resulta no desenvolvimento e progressão neoplásicos (TRIFA et al., 2013; BELO et al., 2015). Esse gene foi descrito como alvo de silenciamento epigenético por meio de metilação das ilhas CpG de sua região promotora, e sua supressão já foi descrita em alguns tipos de neoplasias, tais como as de mama, de pulmão, de próstata, gastrointestinais e cervicais, o que confirma seu papel antitumoral (DELMAS et al., 2011; van der MEIDE et al., 2011; TRIFA et al., 2013).

Delmas et al. (2011) demonstraram que o gene *WIFI* é alvo do silenciamento epigenético em carcinoma de células escamosas da cérvix uterina e que esse é um evento molecular frequente nesse tipo de câncer, podendo levar à desregulação da via Wnt durante a carcinogênese cervical. Trifa et al. (2013) concluíram que a perda da expressão desse gene é relacionada com a agressividade de câncer de mama, podendo ser útil como biomarcador de predição de prognóstico. van der Meide et al. (2011) analisaram nove promotores de metilação antagonistas de Wnt (*APC*, *AXIN2*, *DKK3*, *SFRP2*, *SFRP4*, *SFRP5*, *SOX17*, *WIFI* e *Wnt5A*) com o objetivo de identificar novos marcadores aplicáveis para a detecção de neoplasias glandulares. Estes autores observaram que a metilação do gene *WIFI* foi significativamente maior em casos de câncer do que em amostras com diagnóstico negativo para neoplasia – as quais não apresentaram metilação desse gene.

## 2. JUSTIFICATIVA

O estadiamento de qualquer tipo de câncer é importante para avaliar o prognóstico, pois a sobrevida varia de acordo com o grau de disseminação tumoral. A sobrevida em cinco anos é maior quando a neoplasia é detectada em estágios menos avançados, indicando que a doença, se tratada na fase inicial, pode ser completamente curada e elevar potencialmente a sobrevida global (SALES, 2015; INCA, 2016).

Estudos epidemiológicos e moleculares estabeleceram que a infecção persistente por HPV é essencial para o desenvolvimento do câncer de colo do útero e que os HPV 16 e 18 são os que têm maior potencial carcinogênico. Os HPV 16, 18, 31 e 33 são responsáveis por 90% dos casos de câncer de colo do útero. Desses, o HPV 16 é o mais prevalente, detectado em mais de 50% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999; HOORY et al., 2008; de SANJOSE et al., 2010; LI et al., 2011).

A literatura têm demonstrado que a metilação de genes supressores de tumor está relacionada com o desenvolvimento do câncer. O gene *WIFI* foi identificado como alvo de silenciamento epigenético, que ocorre por meio de metilação de sua região

promotora. A supressão desse gene já foi descrita em algumas neoplasias, tais como a de mama, pulmão, próstata, gastrointestinal e do colo do útero – o que confirma seu papel antitumoral (DELMAS et al., 2011; van der MEIDE et al., 2011; TRIFA et al., 2013).

O câncer do colo do útero é uma doença multifatorial que pode se desenvolver a partir de diferentes vias biológicas e moleculares. Logo, é interessante analisar a associação do estadiamento, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI* com o prognóstico e a sobrevida de mulheres com câncer do colo do útero, a fim de se obter mais informações que ajudem na compreensão de possíveis mecanismos importantes para a patogenicidade dessa neoplasia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o estadiamento, a distribuição dos genótipos de HPV e a presença da metilação do gene *WIFI* em câncer do colo do útero e testar a associação entre estas variáveis e a idade, o prognóstico e a sobrevida de mulheres com esta neoplasia.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar a distribuição dos genótipos de HPV e a presença da metilação do gene *WIFI* em neoplasias escamosas e glandulares do colo do útero.
- Avaliar a possível associação entre genótipos de HPV, presença da metilação do gene *WIFI*, tipo histológico e estadiamento tumoral.
- Analisar a possível associação entre prognóstico e idade, estadiamento tumoral, tipos histológico, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI*.
- Determinar a sobrevida global em relação ao estadiamento, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI*.

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do estudo**

Este é um estudo de coorte retrospectiva constituído por dois grupos. O primeiro grupo foi constituído por mulheres com diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso invasor e o segundo, por mulheres portadoras de adenocarcinoma endocervical invasor.

### **4.2. Seleção de casos**

A seleção de casos foi feita a partir de uma busca ativa nos registros informatizados dos exames anatomopatológicos realizados no Departamento de Anatomia Patológica no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Go no ano de 2006. Essa busca resultou em 214 casos com diagnóstico de câncer do colo do útero. Os espécimes tumorais relativos ao diagnóstico primários desses tumores foram levantados a partir do arquivo de blocos. A revisão dos prontuários resultou em 78 casos de carcinomas microinvasores ou *in situ*, que foram excluídos deste estudo. Dentre os 136 casos restantes, 18 não tiveram os blocos encontrados ou não apresentaram material histológico suficiente para a análise, e 23 casos não mostraram quantidade de DNA suficiente ou adequada para as análises moleculares. O grupo de análise consistiu, portanto, em 95 casos, incluindo 73 carcinomas escamosos e 22 adenocarcinomas endocervicais invasores (figura 8).

### **4.3. Coleta de dados**

Os dados obtidos através dos prontuários foram transcritos manualmente para uma ficha de registro especialmente elaborada para este estudo. A ficha continha as seguintes informações: número de matrícula, iniciais do nome, data de nascimento, data do diagnóstico, número do exame anatomopatológico, respectivos diagnósticos histológicos, estadiamento tumoral, data do último seguimento, evolução até a data do último seguimento, o genótipo de HPV presente e o resultado da análise de metilação do gene *WIFI*. Os dados foram revistos manualmente para correção do preenchimento e, a seguir, inseridos em planilha digital (Excel®).

#### 4.4. Variáveis

##### 4.4.1. VARIÁVEL DEPENDENTE

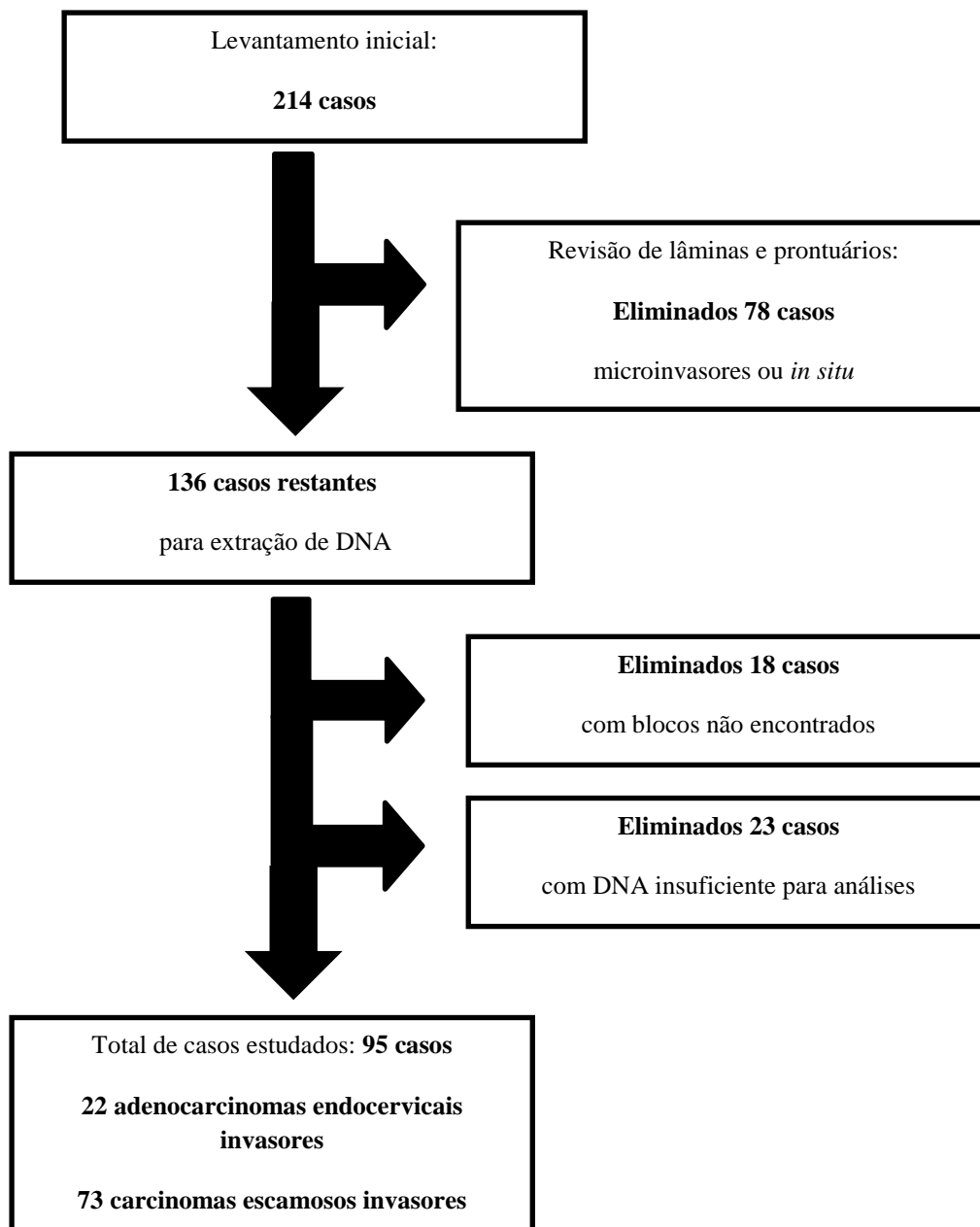
Diagnóstico histopatológico do colo uterino incluindo:

- Carcinoma escamoso invasor.
- Adenocarcinoma endocervical invasor.

##### 4.4.2. VARIÁVEIS INDEPENDENTES

- Estadiamento da neoplasia cervical escamosa ou glandular.
- Genótipo de HPV presente nos diagnósticos histopatológicos acima especificados.
- Metilação do gene *WIFI*.

**Figura 8.** Fluxograma de obtenção do total de casos estudados



#### 4.5. Diagnóstico histológico

Os resultados histológicos foram avaliados e revisados segundo critérios de Scully et al (1994). O estadiamento da neoplasia do colo do útero foi estabelecido de acordo com os critérios estabelecidos pela FIGO (2009), descritos no quadro 1.

**Quadro 1.** Estadiamento da FIGO (2009) para o câncer de colo do útero

Estágio	Características clínicas
0	Tumor limitado ao colo do útero
IA	Carcinoma microinvasor, com profundidade $\leq 5$ mm e extensão $\geq 7$ mm
IA1	Invasão do estroma $\leq 3$ mm em profundidade e $\leq 7$ mm em extensão
IA2	Invasão do estroma $> 3,0$ mm e $\leq 5$ mm em profundidade e $\leq 7$ mm em extensão
IB	Lesões invasivas, clinicamente visíveis, mas limitadas ao colo do útero ou doença microscópica acima de Ia*
IB1	Lesão clinicamente visível $\leq 4$ cm na sua maior dimensão
IB2	Lesão clinicamente visível $> 4$ cm na sua maior dimensão
II	Carcinoma com invasão para além do útero, mas não atingindo a parede pélvica ou o 1/3 inferior da vagina
IIA	Sem invasão dos paramétrios
IIA1	Lesão clinicamente visível $\leq 4$ cm na sua maior dimensão
IIA2	Lesão clinicamente visível $> 4$ cm na sua maior dimensão
IIB	Com invasão dos paramétrios
III	Extensão para a parede pélvica e/ou envolvimento do 1/3 inferior da vagina e/ou hidronefrose ou rim não funcionando**
IIIA	Envolvimento do 1/3 inferior da vagina sem envolvimento da parede pélvica
IIIB	Extensão para a parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não funcionando
IV	Extensão para além da pélvis ou envolvimento (confirmado por biopsia) da mucosa da bexiga ou reto
IVA	Envolvimento de órgãos adjacentes
IVB	Envolvimento de órgãos à distância

\*Todas as lesões macroscopicamente visíveis, mesmo com invasão superficial, devem ser incluídas no estágio Ib. Invasão é limitada a um máximo de invasão do estroma em profundidade de 5 mm e um máximo de extensão horizontal de 7 mm A invasão em profundidade não deve ser superior a 5 mm, tendo sempre como referência de base o epitélio do tecido original. Esta invasão deve ser sempre reportada em milímetros.

\*\*Ao toque retal detecta-se que a parede pélvica se encontra livre de tumor. Todos os casos de hidronefrose ou rim não funcionando devem ser incluídos, a menos que sejam devido a outras causas.

Fonte: adaptado de FIGO, 2009.

## 4.6. Análise molecular

### 4.6.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Após a seleção, os cortes dos blocos parafinados foram utilizados para a extração de DNA. Para remover a parafina, foram adicionados 750µL de xilol P.A. (Vetec®, Brasil) ao tubo contendo os cortes, seguida por agitação vigorosa por 1 minuto, centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Essa etapa foi feita duas vezes para garantir máxima remoção da parafina. Em seguida, 500µL de etanol P.A. (Vetec®, Brasil) foram adicionados e os tubos agitados vigorosamente por 30 segundos, centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi removido por inversão do tubo. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de etanol diluído a 50%, seguida de agitação vigorosamente por 30 segundos, centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm, e o sobrenadante foi removido por inversão do tubo. O tecido secou por 24 horas à temperatura ambiente.

Ao tecido seco foram adicionados 300µL de proteinase K (Invitrogen®, EUA) diluída a 0,1% em tampão de dodecil-sulfato de sódio (SDS) com pH 9,0 e incubado por no mínimo 24 horas, a 55°C e sob agitação leve. Após esse período, foram adicionados 300µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v e pH 8,0 – Invitrogen®, EUA), os tubos foram vigorosamente por 1 minuto e centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante, constituído pela fase aquosa, foi separado em um tubo novo e a ele foram acrescentados 100µL de acetato de amônio 7,5M (Sigma-Aldrich®, EUA) e 1000µL de etanol P.A. gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão do tubo e o DNA foi precipitado por até 24 horas a -20°C.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. Para lavagem do DNA precipitado, foram adicionados 1000µL de etanol diluído a 70% e gelado, a homogeneização foi feita por inversão dos tubos e estes foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e a 4°C. Essa etapa foi feita duas vezes e, ao final da segunda, o DNA secou à temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas. A ressuspensão foi feita com 50µL de água Mili-Q estéril. Depois de o DNA ressuspensão ficar por 1 hora com a 37°C, foi quantificado utilizando o NanoDrop® (Thermo Scientific®, EUA). Para padronização e otimização da etapa de pipetagem, diluiu-se o DNA a 50ng/µL, caso a concentração tivesse sido superior a 100 ng/µL. Todo o material obtido foi estocado a -20°C.

#### 4.6.2. DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV

A detecção e genotipagem de HPV foram realizadas utilizando-se os kits comerciais *INNO-LiPA HPV Genotyping ExtraAMP*® (Innogenetics®, Bélgica) e *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra*® (Innogenetics®, Bélgica), respectivamente. Esse é um ensaio comercial baseado no princípio de hibridização reversa, projetado para identificação de genótipos do vírus HPV através da detecção de sequências específicas na região L1 do genoma do HPV. Essas sequências foram amplificadas por *primers* SPF<sub>10</sub> (65pb) biotinizados, desnaturados e hibridizados com sondas específicas fixadas em linhas paralelas em tiras de membrana de nylon. O ensaio permite a detecção simultânea e independente de 15 genótipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), 3 de provável alto risco (26, 53 e 66), 7 de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 43, 44, 54 e 70) e três que não são classificados quanto ao risco (69, 71 e 74). Todas as instruções do fabricante foram seguidas para realização dos testes. Para a detecção e genotipagem de HPV, utilizou-se 100ng do DNA extraído e o equipamento automatizado Autoblott 3000H® (Fujirebio®, Bélgica).

#### 4.6.3. ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE *WIFI*

O método MSP (*methylation specific PCR*) é usado para detectar a metilação de ilhas CpG no genoma humano. Primeiramente, o DNA foi tratado com bissulfito de sódio, que converte bases de citosina não metiladas em uracila, a qual é reconhecida por *primers* de PCR como timina. Uma PCR foi realizada usando um par de *primers* para amplificar um fragmento da região promotora do gene *WIFI* que estava metilada.

O tratamento de 1ng do DNA extraído com bissulfito de sódio foi realizado com auxílio do kit comercial *EpiTect Bisulfite*® (Qiagen®, EUA), seguindo-se todas as instruções do fabricante.

Todos os testes descritos a seguir foram realizados conforme descrito por van der Meide et al. (2011), incluindo as sequências dos *primers* utilizados. Foram utilizados 5µL do DNA tratado com bissulfito para as PCRs específicas para o gene *WIFI*, nas quais usou-se *primers* seletivos para os alelos metilados. A ciclagem foi feita no equipamento Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®, EUA) deuse com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 52 °C e 30 segundos a 72°C) e extensão final a 72°C por 10 minutos. O volume final das reações foi de 25µL e contendo 0,2µM de cada primer, 200µM de dNTPs (Invitrogen®, EUA) e 1 unidade de Taq Platina

(Invitrogen®, EUA). Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%, corado por nitrato de prata e visualizado sob luz branca fluorescente. O controle negativo foi água deionizada e autoclavada.

As sequências dos *primers* usados nesses testes estão descritas no quadro 2.

**Quadro 2.** Sequências de primers utilizados na MSP

Gene	Sequência (5' -3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto de PCR (pb)	Ciclos de PCR
<i>WIFI</i>	(F) GGCGTTTATTGGGCGTATC (R) AAAACTAACGCGAACGAAATACG	52	150	35

(pb): pares de bases; (F): foward; (R): reverse

#### 4.7. Processamento e análise dos dados

A análise estatística foi realizada usando-se o programa SPSS (8.2) Associações entre o estadiamento, tipo histológico da neoplasia, genótipos de HPV e a metilação do gene *WIFI* com a idade e o prognóstico das mulheres foram analisadas utilizando-se *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier pelo programa *GraphPad Prism* (4.0), sendo a comparação das médias de sobrevida e os fatores prognósticos analisada pelo teste *log-rank*. Um valor de  $p \leq 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### 4.8. Aspectos éticos

Neste estudo foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (2013), mantendo-se em sigilo a identidade das mulheres, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto. As análises realizadas neste estudo não implicaram em quaisquer modificações no tratamento da doença e em momento algum foram introduzidas condutas adicionais. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às mulheres, pois toda a pesquisa foi realizada por meio de manuseio do material de biópsia incluso em blocos de parafina. Esse projeto foi aprovado no Comitê de Ética do Hospital Araújo Jorge, de acordo com o parecer de número 839.213 (anexo 1).

## 5. RESULTADOS

As idades das 95 mulheres, no momento do diagnóstico, variaram entre 26 e 91, sendo a média e a mediana de 51 anos. A caracterização sociodemográfica e comportamental dessa população está descrita na tabela 1.

**Tabela 1.** Características sociodemográficas e comportamentais da população em estudo

<b>Características</b>	<b>n (%)</b>
<b>Idade</b>	
≤ 30	8 (8,4)
31-40	14 (14,7)
41-50	22 (23,2)
51-60	20 (21,1)
> 60	31 (32,6)
<b>Estado civil</b>	
Solteira	20 (21)
Casada	42 (44,2)
<b>Idade de início da atividade sexual</b>	
< 18	28 (29,5)
≥ 18	11 (11,6)
<b>Tabagismo</b>	
Sim	19 (20)
Não	49 (51,6)
Ex tabagista	16 (16,9)
<b>Etilismo</b>	
Sim	7 (7,4)
Não	67 (70,5)

Dentre as 95 amostras, 76,8% (73/95) tinham diagnóstico de carcinoma escamoso invasor e 23,2% (22/95), de adenocarcinoma endocervical invasor. Para os

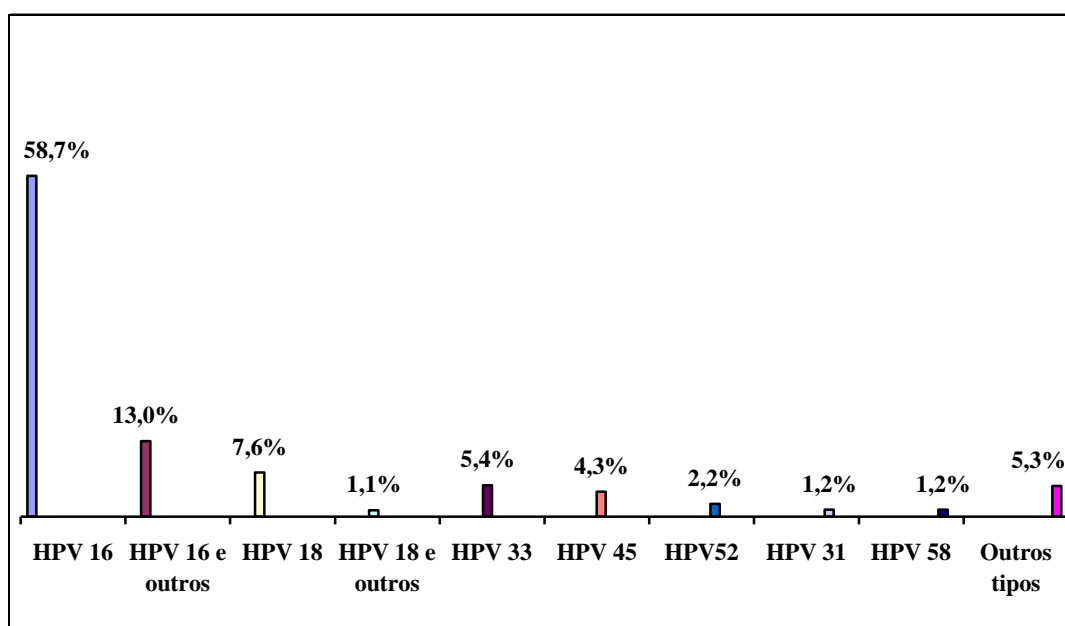
carcinomas escamosos e adenocarcinomas endocervicais, 69,9% e 77,3% dos diagnósticos, respectivamente, se deram no início do desenvolvimento neoplásico, ou seja, nos estágios I e II (tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição dos estágios da neoplasia cervical de acordo com o tipo histológico

Estágio	n (%)
<b>Carcinomas escamosos</b>	
I – II	51 (69,9)
III – IV	22 (30,1)
<b>Adenocarcinomas endocervicais</b>	
I – II	17 (77,3)
III – IV	5 (22,7)

A prevalência total de HPV foi de 96,8% (92/95). O HPV 16 foi o mais prevalente (58,7% - 54/92), seguido pelo HPV 18 (7,6% - 7/92), HPV 33 (5,4% - 5/92), HPV 45 (4,3% - 4/92), HPV 52 (2,2% - 2/92) e HPV 31, 35, 53, 56 e 58 (1,2% - 1/82 cada) (figura 9).

**Figura 9.** Prevalência dos genótipos de HPV nas 92 amostras positivas para infecção viral



A prevalência do HPV 16 foi de 72,6% nos carcinomas escamosos e de 59,2% nos adenocarcinomas endocervicais. Em ambos os tipos histológicos, esse genótipo viral foi detectado mais frequentemente nos estágios I e II: 75,5% para os carcinomas escamosos e 69,2% para os adenocarcinomas endocervicais. O HPV 18 foi mais prevalente neste tipo histológico (13,6%) que nos carcinomas escamosos (6,9%). Nos carcinomas escamosos, 60% dos casos positivos para o HPV 18 corresponderam a neoplasias em estágios III e IV, e nos adenocarcinomas endocervicais, 100% dos casos positivos para esse genótipo viral corresponderam a neoplasias nos estágios I e II. Outros genótipos de HPV, incluindo os HPV 33, 45, 52, 31 e 58, tiveram resultados semelhantes ao HPV 16, sendo mais detectados em carcinomas escamosos em estágios I e II. As três amostras que foram negativas para infecção por HPV correspondiam a adenocarcinomas endocervicais (tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição dos genótipos de HPV de acordo com o tipo histológico e o estadiamento tumoral

TIPO HISTOLÓGICO E ESTADIAMENTO	GENÓTIPOS DE HPV (INFECÇÕES SIMPLES OU MÚLTIPLAS)			
	16 n (%)	18 n (%)	Outros n (%)	Negativos n (%)
<b>Carcinoma escamoso</b>				
<b>I/II</b>	40 (75,5)	2 (40)	9 (60)	0
<b>III/IV</b>	13 (24,5)	3 (60)	6 (40)	0
<b>Total</b>	53 (72,6)	5 (6,9)	15 (20,5)	0
<b>Adenocarcinoma endocervical</b>				
<b>I/II</b>	9 (69,2)	3 (100)	3 (100)	2 (66,7)
<b>III/IV</b>	4 (30,8)	0	0	1 (33,3)
<b>Total</b>	13 (59,2)	3 (13,6)	3 (13,6)	3 (13,6)

Infecções simples são as que apresentam apenas um genótipo de HPV. Infecções múltiplas são as que apresentam mais de um genótipo de HPV.

A positividade para metilação do gene *WIFI* foi de 45,3%. A tabela 4 mostra que dentre os carcinomas escamosos, 42,5% foram positivos para metilação desse gene. Nesse tipo histológico, 74,2% dos casos positivos para metilação de *WIFI* correspondeu a neoplasias nos estágios I e II. Esse resultado se repetiu nos adenocarcinomas endocervicais, dentre os quais 54,5% foram positivos para metilação, sendo que 83,3% correspondiam a neoplasias nos estágios I e II.

**Tabela 4.** Distribuição dos casos positivos e negativos para metilação do gene *WIFI* de acordo com a origem e estadiamento da neoplasia

TIPO HISTOLÓGICO E ESTADIAMENTO	METILAÇÃO DO GENE <i>WIFI</i>	
	Positivo n (%)	Negativo n (%)
<b>Carcinoma escamoso</b>		
<b>I/II</b>	23 (74,2)	28 (66,7)
<b>III/IV</b>	8 (25,8)	14 (33,3)
<b>Total</b>	31 (42,5)	42 (57,5)
<b>Adenocarcinoma endocervical</b>		
<b>I/II</b>	10 (83,3)	7 (70)
<b>III/IV</b>	2 (16,7)	3 (30)
<b>Total</b>	12 (54,5)	10 (45,5)

A análise da evolução até a data do último seguimento mostrou uma taxa de óbito de 15,8% (15/95). Mulheres vivas e sem sinais da doença representaram 54,7% (52/95) dos casos e 29,5% (28/95) foram representados por mulheres vivas mas com evidência de doença. Dentre aquelas com diagnóstico de carcinoma escamoso e que estavam vivas e sem evidência ao final do seguimento, 86,5% tiveram o câncer detectado em estágios I e II, 100% e 45,9% foram positivas para infecção por HPV e para metilação do gene *WIFI*, respectivamente. Em relação às mulheres diagnosticadas com adenocarcinoma endocervical e que estavam vivas e sem evidência de doença ao final do seguimento, 93,3% tiveram neoplasias detectadas em estágios I e II, 80% e 60% foram positivas para

infecção por HPV e para metilação do gene *WIFI*, respectivamente. Em relação às mulheres falecidas ao final do seguimento, 72,7% daquelas diagnosticadas com carcinoma escamoso foram positivas para metilação do gene *WIFI*, e 75% daquelas diagnosticadas com adenocarcinomas endocervicais foram negativas para metilação do gene *WIFI* (tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição dos casos de acordo com o tipo histológico, estadiamento, infecção por HPV e metilação do gene *WIFI* e evolução até a data do último seguimento

	<b>Carcinoma escamoso</b>		
	<b>Viva sem sinais de doença</b>	<b>Viva com sinais de doença</b>	<b>Óbito</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Estágios I e II</b>	32 (86,5)	13 (52)	6 (54,5)
<b>Estágios III e IV</b>	5 (13,5)	12 (48)	5 (45,4)
<b>Total</b>	37 (50,7)	25 (34,3)	11 (15)
<b>Positivo para infecção por HPV</b>	37 (100)	25 (100)	11 (100)
<b>Negativo para infecção por HPV</b>	0	0	0
<b>Total</b>	37 (50,7)	25 (34,3)	11 (15)
<b>Positivo para metilação</b>	17 (45,9)	6 (24)	8 (72,7)
<b>Negativo para metilação</b>	20 (54,1)	19 (76)	3 (27,3)
<b>Total</b>	37(50,7)	25 (34,3)	11 (15)

Tabela 5. Continuação

<b>Adenocarcinoma endocervical</b>			
	<b>Viva sem sinais de doença</b>	<b>Viva com sinais de doença</b>	<b>Óbito</b>
<b>Estágios I e II</b>	14 (93,3)	3 (100)	0
<b>Estágios III e IV</b>	1 (6,7)	0	4 (100)
<b>Total</b>	15 (68,2)	3 (13,6)	4 (18,2)
<b>Positivo para infecção por HPV</b>	12 (80)	3 (100)	4 (100)
<b>Negativo para infecção por HPV</b>	3 (20)	0	0
<b>Total</b>	15 (68,2)	3 (13,6)	4 (18,2)
<b>Positivo para metilação</b>	9 (60)	2 (66,7)	1 (25)
<b>Negativo para metilação</b>	6 (40)	1 (33,3)	3 (75)
<b>Total</b>	15 (68,2)	3 (13,6)	4 (18,2)

Houve associação estatisticamente significativa entre o estadiamento tumoral em III e IV e pior prognóstico, definido como morta pela doença e viva com sinais de doença em mulheres com câncer do colo do útero. As demais variáveis (tipo histológico, infecção por HPV e metilação do gene *WIFI*) não mostraram associação estatisticamente com o prognóstico da neoplasia (tabela 6).

**Tabela 6.** Associação entre o prognóstico e estadiamento tumoral, tipo histológico da neoplasia, infecção por HPV e metilação do gene *WIFI*

Variáveis	Pior prognóstico	
	OR (IC 95%)	P
Estadiamento	7,32 (2,35 – 23,83)	0,000
Tipo histológico	0,48 (0,15 – 1,45)	0,15
Infecção por HPV	3,52 (0,35 – 85,92)	0,24
Metilação do gene <i>WIFI</i>	0,65 (0,27 – 1,60)	0,41

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . A classificação de “pior prognóstico” constituiu-se de casos em que a evolução da paciente foi “viva com evidência de doença” ou “óbito” na data do último seguimento registrada no prontuário. O controle negativo para o prognóstico foram casos em que o último seguimento registrado no prontuário foi “viva sem sinais de doença”.

A tabela 7 mostra que houve associação significativa entre mulheres na faixa etária entre 50 e 60 anos e estadiamento tumoral. Nesse caso, a idade apresentou efeito protetor em relação a estágios mais avançados, ou seja, nessa faixa etária, as mulheres tiveram menores chances de serem diagnosticadas com neoplasias mais avançadas. Esse efeito não foi observado para mulheres acima dos 70 anos de idade ou com menos de 40 anos. Não houve associação estatisticamente significativa entre a faixa etária e infecção pelos genótipos HPV 16 e 18 e positividade para metilação do gene *WIFI*.

**Tabela 7.** Associação entre estadiamento da neoplasia, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI* e faixa etária

Variáveis	OR (95% IC)				
	30 anos	40 anos	50 anos	60 anos	70 anos
<b>Estadiamento</b>					
III e IV	0,28 (0,01 – 2,38)	0,29 (0,06 – 1,17)	0,15 (0,04 – 0,48)	0,27 (0,09 – 0,74)	0,20 (0,06 – 1,33)
I e II	-	-	-	-	-
<b>Genótipos de HPV</b>					
HPV 16/18	2,59 (0,30 – 58,22)	8,96 (1,15 – 189,24)	1,53 (0,57 – 4,15)	2,29 (0,85 – 6,14)	1,89 (0,43 – 8,29)
Outros tipos	-	-	-	-	-
<b>Metilação do gene <i>WIFI</i></b>					
Metilado	0,46 (0,06 – 2,89)	1,46 (0,49 – 4,41)	0,99 (0,40 – 2,40)	0,86 (0,34 – 2,16)	1,58 (0,34 – 7,64)
Não metilado	-	-	-	-	-

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

A tabela 8 mostra que mulheres com idade acima dos 51 anos (média e mediana das idades da população de estudo) tiveram mais chance de serem diagnosticadas com neoplasias em estágios III e IV. Esse dado não contraria o resultado da tabela 7, pois nesse grupo estavam inclusas as mulheres com mais de 70 anos, que, de acordo com a história natural da doença e com os resultados do presente estudo, são mais susceptíveis ao diagnóstico em estágios mais avançados. Não houve associação significativa entre idade acima dos 51 anos e infecção por HPV 16 e 18 e positividade para metilação do gene *WIFI*.

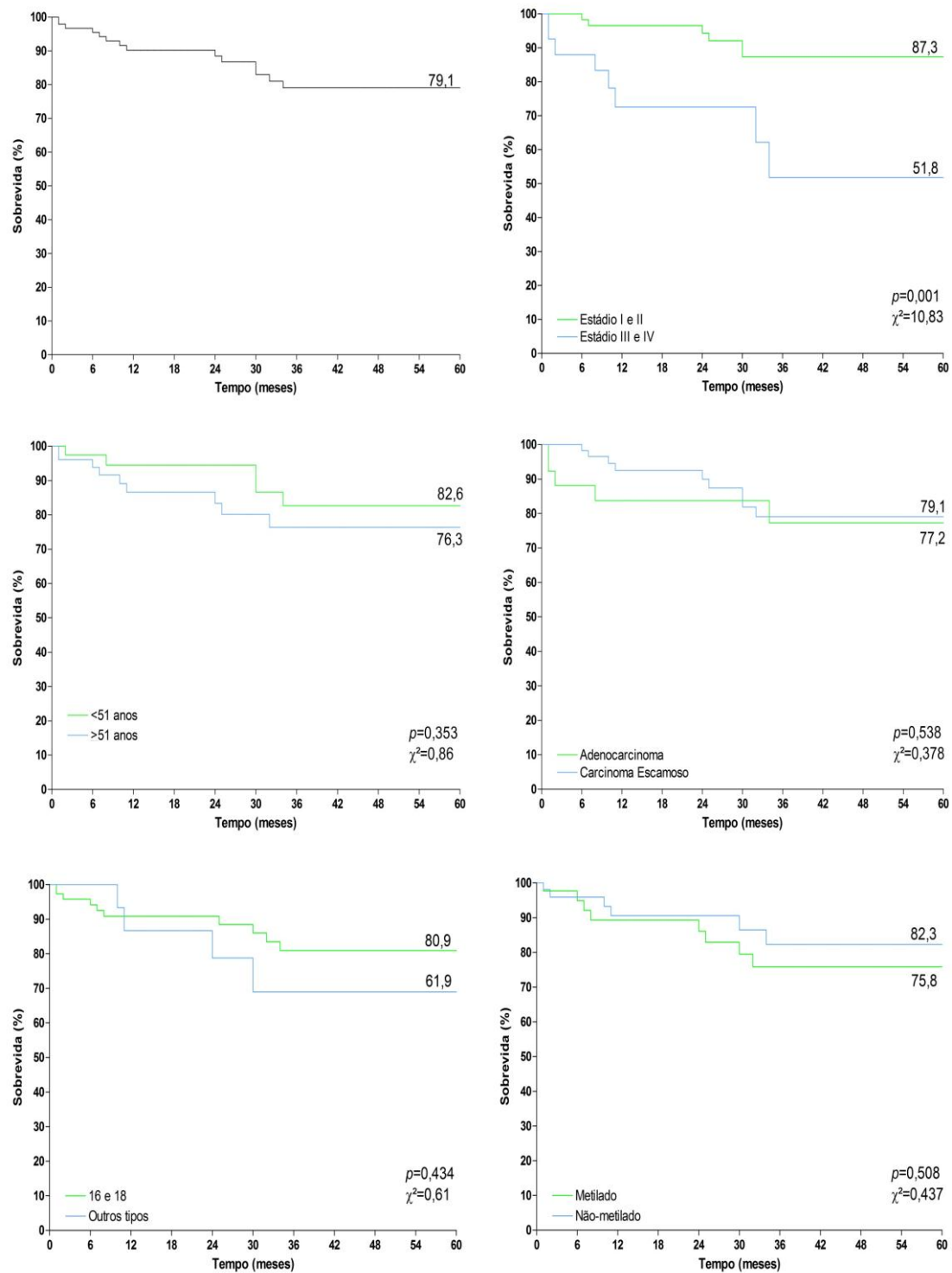
**Tabela 8.** Associação entre estadiamento da neoplasia, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI* e idade

<b>Variáveis</b>	$\geq 51$ anos N	$< 51$ anos N	OR (IC 95%)	<i>P</i>
<b>Estadiamento</b>				
III e IV	22	5	5,92	0,0006
I e II	29	39	(1,82 – 20,39)	
<b>Genótipos de HPV</b>				
HPV 16/18	38	36	1,54	0,39
Outros tipos	13	8	(0,52 – 4,66)	
<b>Metilação do gene <i>WIFI</i></b>				
Metilado	23	20	0,99	0,97
Não metilado	28	24	(0,40 – 2,40)	

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ .

A sobrevida global em cinco anos dos 95 casos analisados foi de 79,1%. Quando analisada em relação ao estadiamento, a sobrevida foi significativamente maior nos casos com estágios I e II. Não houve diferença significativa na sobrevida quando analisada para a média e mediana da idade, o tipo histológico da neoplasia, infecção por diferentes genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI* (figura 10).

**Figura 10.** Sobrevida global em cinco anos dos 95 casos analisados e de acordo com o estadiamento da neoplasia, idade, tipo histológico, genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI*



A sobrevida foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Um valor de  $p < 0,005$  foi considerado estatisticamente significativo.  $X^2$ : teste do Qui-quadrado.

## 6. DISCUSSÃO

O estadiamento tumoral em III e IV foi determinante de pior prognóstico e menor sobrevida das mulheres desse estudo. A idade, o tipo histológico, infecção pelos HPV 16 e 18 e positividade para metilação do gene *WIFI* não se associaram a pior prognóstico ou menor sobrevida.

A sobrevida global foi de 79,1%. No Brasil, os valores de sobrevida variam entre 48% e 66,7% (SALES, 2015). Em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Austrália, França e Inglaterra, a sobrevida varia de 60% a 70% (NAKAGAWA et al., 2011). Ao final do seguimento de cinco anos, mulheres vivas e sem sinais da doença representaram 54,7% (52/95) dos casos. Mulheres com câncer do colo do útero diagnosticado em estágios III e IV tiveram pior prognóstico e menor sobrevida quando comparadas àquelas com neoplasias diagnosticadas nos estágios I e II.

Estudos prévios demonstraram pior prognóstico em mulheres diagnosticadas com a doença em estágios avançados (ZARCHI et al., 2010; GUO et al., 2015, SALES, 2015). Zarchi et al. (2010) observaram maior taxa de sobrevivência nos casos com estágio IIB quando comparados a casos com estágio IIIB. Sales (2015) observou menor sobrevida nos estágios III e IV, bem como maior número de óbitos em mulheres com estágios mais avançados. Esses resultados reforçam que o prognóstico da doença é melhor quando ela é detectada em estágios menos avançados. O objetivo principal do rastreamento bem organizado é o diagnóstico precoce, ainda em fases pré-invasoras (SANKARANARAYANAN, 2014), esta seria a situação ideal. Porém, quando isso não é possível, o diagnóstico nos estágios iniciais mostra maior probabilidade de sobrevida livre de doença.

Dentre as 95 mulheres cujas amostras foram analisadas, aquelas que se encontravam com idade acima dos 51 anos apresentaram maior risco de serem diagnosticadas com a neoplasia em estágios mais avançados. Esse dado corrobora a história natural da doença, que tem evolução lenta e leva, em média, de 10 a 30 anos para progredir de uma lesão inicial, que ocorre geralmente por volta dos 20 a 30 anos de idade, para a forma invasora (VINK et al.; 2013; STEENBERGEN et al., 2014).

Um estudo transversal realizado no Brasil com 37.638 casos de câncer do colo do útero mostrou que a proporção de mulheres diagnosticadas em estágios mais avançados da doença foi maior do que a de mulheres nos estágios iniciais, com predominância do estágio III. Concluiu-se, portanto, que o diagnóstico dessa neoplasia ainda ocorra tardiamente no país (THULER; AGUIAR; BERGMANN, 2014). No presente estudo,

71,6% dos diagnósticos se deu com a neoplasia nos estágios I e II, o que provavelmente contribuiu para a elevada sobrevida global e melhor prognóstico.

Dentre os tipos histológicos do câncer de colo do útero, o carcinoma de células escamosas é o mais comum e corresponde a cerca de 80% dos casos (XIE et al., 2012; SCHLICHTE; GUIDRY, 2015). A taxa de adenocarcinomas varia entre 20 e 25% (FUJIWARA et al., 2014; NOWAKOWSKI et al., 2016). Dentre as 95 amostras analisadas, a maior parte foi composta de carcinomas escamosos invasivos. de Sanjose et al. (2010) conduziram um estudo retrospectivo com 8.977 amostras de neoplasias invasivas oriundas de 38 países europeus, das quais 91,9% corresponderam a carcinomas escamosos. Na China, dentre 255 casos analisados, 85,5% eram escamosos (XIE et al., 2012). Na Turquia, essa taxa foi de 87,8% (TEKE et al., 2015) e, no Brasil, de 83,7% (de OLIVEIRA et al., 2013). No presente estudo, os adenocarcinomas corresponderam a 23,2% dos casos.

Quanto ao prognóstico, os resultados são controversos. Em alguns estudos há similaridade na sobrevida de mulheres com carcinomas escamosos e adenocarcinomas (HELLMAN; HELLSTROM; PETTERSSON, 2014; NOWAKOWSKI et al., 2016). No entanto, outros estudos relatam que, no mesmo estadiamento, neoplasias de origem glandular apresentam pior evolução, com diferença de 10 a 20% na sobrevida em cinco anos quando comparadas às neoplasias de origem escamosa (GIEN; BEAUCHEMIN; THOMAS, 2010; NOWAKOWSKI et al., 2016). A diferença na sobrevida entre esses dois tipos histológicos aparece à medida que aumenta o estadiamento (GIEN; BEAUCHEMIN; THOMAS, 2010). No presente estudo, o diagnóstico de neoplasia glandular não se associou a pior prognóstico nem a menor sobrevida, o que pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos casos correspondia a carcinomas escamosos diagnosticados nos estágios I e II, não sendo, assim, possível perceber diferenças significativas na sobrevida entre os dois tipos histológicos.

Em âmbito mundial, os HPV 16 e 18, alvos das vacinas bivalente e quadrivalente, são responsáveis por aproximadamente 70% dos carcinomas cervicais (WAGNER et al., 2015). de Sanjose et al. (2010) e Li et al. (2011), em meta-análises desenvolvidas com amostras de vários países ao redor do mundo, relataram prevalência de 71% e 72,5%, respectivamente, desses dois genótipos em casos de neoplasia invasiva. Na Tailândia, esse número foi superior a 60% (KIETPEERAKOOL; KLEEBKAOW; SRISOMBOON, 2015) e no Brasil e na China, superior a 90% (de OLIVEIRA et al., 2013; YANG et al., 2014). Outros genótipos de alto risco oncogênico, HPV 31, 33, 45,

52 e 58, em conjunto com os HPV 16 e 18, estão presentes em 90% dos casos e são alvos da vacina nonavalente, já comercializada em alguns países (WAGNER et al., 2015). Em consonância com esses dados, esses sete genótipos de HPV estiveram entre os mais prevalentes nas 95 amostras analisadas. Cabe ressaltar que houve alta prevalência de HPV 16 nos casos de adenocarcinoma endocervical, mesmo resultado descrito por de Oliveira et al. (2013).

Sabe-se que a infecção persistente pelo HPV é essencial para o desenvolvimento do câncer de colo do útero e que os HPV 16 e 18 são os que têm maior potencial carcinogênico (WALBOOMERS et al., 1999; de SANJOSE et al., 2010; de OLIVEIRA et al., 2013). Embora o potencial oncogênico desses genótipos de HPV esteja bem estabelecido, estudos recentes não relataram associação entre a infecção por HPV 16 e 18 e pior prognóstico ou menor sobrevida das mulheres com câncer invasor (ZAMPRONHA et al., 2013; CUSCHIERI et al., 2014; LAU et al., 2015). No presente estudo, não houve associação significativa entre a infecção por qualquer tipo de HPV e pior prognóstico nem entre a infecção por HPV 16 e 18 e menor sobrevida.

Há relatos de que mulheres infectadas por HPV 16 e 18 têm mais chances de desenvolver lesões precursoras mais graves quando comparadas àquelas com infecção por outros genótipos virais (EINSTEIN et al., 2011; SIDERI et al., 2011). Além disso, Cuschieri et al. (2014) observaram que neoplasias relacionadas aos HPV 16 e 18 não implicam em menor sobrevida comparadas a cânceres relacionados a outros genótipos. Assim, a redução da incidência de câncer relacionado a esses dois genótipos por meio vacinação pode não resultar em melhora da sobrevida do câncer do colo do útero. Acredita-se, então, que os HPV 16 e 18 estejam associados à ocorrência lesões precursoras mais graves em mulheres mais jovens quando comparados a infecção por outros genótipos virais (COUPÉ et al., 2008; SIDERI et al., 2011; PERSSON et al., 2015). É possível que, depois de estabelecida a neoplasia invasora, a evolução desta para estágios mais avançados com consequente pior prognóstico e menor sobrevida seja independente do genótipo de HPV.

Dentre as 95 amostras analisadas, 45,3% foram positivas para metilação do gene *WIFI*. A positividade para metilação do gene *WIFI* foi de 54,5% em adenocarcinomas endocervicais e de 42,5% em carcinomas escamosos. van der Meide et al. (2011) descreveram que a metilação desse gene é independente do tipo histológico, sendo observada em 71% dos adenocarcinomas e 54% dos carcinomas escamosos. No presente estudo, a positividade dessa variável foi de 48,5% nos estágios I e II e de

37,0% nos estágios III e IV. Lee et al. (2013) observaram que a metilação do gene *WIFI* foi mais frequente em pacientes com câncer de pulmão em estágio I e não teve associação com a sobrevida. Ramachandran et al. (2014) observaram que a metilação desse gene ocorre em lesões precursoras de carcinoma de glândulas salivares, o que indica maior risco de progressão para malignidade da neoplasia. Sabe-se que o silenciamento epigenético do gene *WIFI* é um evento precoce na carcinogênese das neoplasias do colo do útero (SIEGEL et al., 2015). Então, é possível que esse evento seja importante para a progressão das lesões precursoras ao câncer invasor, mas não influencie na evolução neoplásica a estágios mais avançados. Mesmo considerando o pequeno número de casos, é possível que esta seja a razão para pela qual não foi possível estabelecer associação estatisticamente significativa entre essa variável e pior prognóstico ou menor sobrevida das mulheres.

Uma das limitações desse estudo foi o pequeno número de casos de adenocarcinomas, que pode ter influenciado nas análises estatísticas, contribuindo para a não associação entre tipo histológico e pior prognóstico e menor sobrevida. Além disso, o DNA extraído das biópsias não resultou em quantidade suficiente que possibilitasse a quantificação da metilação do gene estudado e permitisse a comparação dessa variável com outros estudos.

Em resumo, pior prognóstico e menor sobrevida das mulheres foram determinados pelo estadiamento tumoral em III e IV. O tipo histológico, a infecção pelos genótipos HPV 16 e 18 e a positividade para metilação do gene *WIFI* não tiveram relação com evolução em pior prognóstico ou menor sobrevida. Provavelmente os resultados do presente estudo seriam diferentes caso fossem incluídos casos diagnosticados com lesões precursoras, já que a infecção pelos genótipos HPV 16 e 18 e a metilação do gene *WIFI* são supostamente mais determinantes no desenvolvimento dessas lesões em menor tempo.

## **7. CONCLUSÕES**

- A maioria dos casos tinha diagnóstico de carcinoma escamoso invasor, nos estágios I e II.
- A prevalência total de HPV foi 96,8%. O HPV 16 foi mais prevalente nos carcinomas escamosos que nos adenocarcinomas endocervicais e nos estágios I e II. O HPV 18 foi mais prevalente nos adenocarcinomas endocervicais que nos

carcinomas escamosos. Nos adenocarcinomas endocervicais, a prevalência desse genótipo viral se deu nos estágios I e II. Outros genótipos de HPV, incluindo os HPV 33, 45, 52, 31 e 58, tiveram resultados semelhantes ao HPV 16. As três amostras que foram negativas para infecção por HPV correspondiam a adenocarcinomas endocervicais.

- A positividade para metilação do gene *WIFI* foi de 45,3%. Dos carcinomas escamosos, 42,5% foram positivos para metilação desse gene e, dos adenocarcinomas, 54,5%. Em ambos os tipos histológicos, a maioria dos casos positivos para metilação se deu nos estágios I e II.
- A análise da evolução até a data do último seguimento mostrou uma taxa de óbito de 15,8% (15/95). Para ambos os tipos histológicos, as mulheres que estavam vivas e sem evidência ao final do seguimento de cinco anos, em sua maioria, teve o câncer detectado em estágios I e II.
- Houve associação estatisticamente significativa entre neoplasias diagnosticadas nos estágios III e IV e evolução da mulher em pior prognóstico.
- Não houve associação estatisticamente significativa entre o pior prognóstico e o tipo histológico, a infecção por HPV e a metilação do gene *WIFI*.
- A sobrevida global em cinco anos foi de 79,1% e foi significativamente maior nos casos com estágios I e II. Não houve diferença significativa na sobrevida quando analisada para a mediana da idade, o tipo histológico da neoplasia, infecção por diferentes genótipos de HPV e metilação do gene *WIFI*.
- A faixa etária entre 50 e 60 anos idade apresentou efeito protetor em relação a estágios mais avançados. Esse efeito não foi observado para mulheres acima dos 70 anos de idade ou com menos de 40 anos. Não houve associação estatisticamente significativa entre a faixa etária e infecção pelos genótipos HPV 16 e 18 e positividade para metilação do gene *WIFI*.

- Mulheres com idade acima dos 51 anos (média e mediana das idades da população de estudo) tiveram mais chance de serem diagnosticadas com neoplasias em estágios III e IV. Não houve associação significativa entre idade acima dos 51 anos e infecção por HPV 16 e 18 e positividade para metilação do gene *WIFI*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.

AGGARWAL, P. Cervical cancer: can it be prevented? **World Journal of Clinical Oncology**, v.5. n.4, p.775-780, 2014.

BELLO, J.; NIEVA, L.; PAREDES, A.; GONZALEZ, A.; ZAVALETA, L.; LIZANO, M. Regulation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4734–4755, 2015.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; van DOORSLAER, K.; zur HAUSEN, H.; de VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v.401, p. 70-79, 2010.

BODILY, J.; LAIMINS, L. a. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33–39, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Campanha de vacinação contra o HPV**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/hpv/>. Acesso em 20 de setembro de 2016.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI): estratégia de vacinação contra o HPV-**

2015. Disponível em: [http://pni.datasus.gov.br/consulta\\_hpv\\_15\\_C24.php](http://pni.datasus.gov.br/consulta_hpv_15_C24.php). Acesso em 20 de setembro de 2016.

BRAVO, I. G.; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, p. 32–51, 2015.

CHEN, Y.; WILLIAMS, V.; FILIPPOVA, M.; FILIPPOV, V.; DUERKSEN-HUGHES, P. Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 2155–2186, 2014.

CHIH, H. J.; LEE, A. H.; COLVILLE, L.; BINNS, C. W.; XU, D. A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. **Nutrition and Cancer**, v.65, p.317-328, 2013.

CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Apmis**, v. 118, n. 6-7, p. 422–449, 2010.

COSTA, M. O. L. P.; HERÁCLIO, S. A.; COELHO, A. V. C.; ACIOLY, V. L.; SOUZA, P. R. E.; CORREIA, M. T. S. Comparison of conventional Papanicolaou cytology samples with liquid-based cervical cytology samples from women in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 831–838, 2015.

COUPÉ, V. M.; BERKHOF, J.; BULKMANS, N. W.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Age-dependent prevalence of 14 high-risk HPV types in the Netherlands: implications for prophylactic vaccination and screening. **British Journal of Cancer**, v. 98, p. 646-651, 2008.

CUSCHIERI, K.; BREWSTER, D. H.; GRAHAM, C.; NICOLL, S.; WILLIAMS, A. R. W.; MURRAY, G. I.; MILLAN, JOHANNESSEN, D.; HARDIE, I. A.; CUBIE, H. A. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with

invasive cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 135, p. 2721-2726, 2014.

DELMAS, A. L.; RIGGS, B. M.; PARDO, C. E.; DYER, L. M.; DARST, R. P.; IZUMCHENKO, E. G.; MONROE, M.; HAKAM, A.; KLADDE, M. P.; SIEGEL, E. M.; BROWN, K. D. is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 11, p. 1625–1633, 2011.

DISCACCIATI, M. G.; SOUZA, C. A. S.; D'OTAVIANNI, M. G.; ÂNGELO-ANDRADE, L. A. L.; WESTIN, M. C. A.; RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L. C. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 155, p. 204-208, 2011.

DISCACCIATI, M. G.; BARBOZA, B. M. S.; ZEFERINO, L. C. Por que a prevalência de resultados citopatológicos do rastreamento do câncer do colo do útero pode variar significativamente entre duas regiões do Brasil? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 5, p. 192–197, 2014.

DOCHEZ, C.; BORGES, J. J.; VERHELST, R.; REES, H. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. **Vaccine**, v.32, n.14, p.1595-1601, 2014.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v.30S, p.F55-F70, 2012.

DROLET, M.; BÉNARD, É.; BOILY, M. C.; ALI, H.; BAANDRUP, L.; BAUER, H.; BEDDOWS, S.; BRISSON, J.; BROTHERTON, J. M.; CUMMINGS, T.; DONOVAN, B.; FAIRLEY, C. K.; FLAGG, E. W.; JOHNSON, A. M.; KAHN, J. A.; KAVANAGH, K.; KJAER, S. K.; KLIEWER, E. V.; LEMIEUX-MELLOUKI, P.; MARKOWITZ, L.; MBOUP, A.; MESHER,

D.; NICCOLAI, L.; OLIPHANT, J.; POLLOCK, K. G.; SOLDAN K.; SONNENBERG, P.; TABRIZI, S. N.; TANTON, C.; BRISSON, M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programs: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Disease**, v.15, n.5, p.565-580, 2015.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human papillomaviruses; epithelial tropisms, and the development of neoplasia. **Viruses**, v.7, p.3863-3890, 2015.

ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; MEIJER, C. J. L. M.; WALBOOMERS, J. M. M. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer**, v.69, p.114–119, 1994.

EINSTEIN, M. H.; GARCIA, F. A.; MITCHELL, A. L.; DAY, S. P. Age-stratified performance of the Cervista HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, p. 1185-1189, 2011.

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R. V.; CARVALHO, M. G. F.; FERNANDES, T. A. A. M.; AZEVEDO, P. R. M.; SOBRINHO, S. J.; PRADO, J. C. M.; VILLA, L. L. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes**, v.3, p.96, 2010.

FIGO: The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. **Gynecology Oncology**, v.115, p.325–328, 2009.

FISCHER, S.; BETTSTETTER, M.; BECHER, A.; LESSEL, M.; BANK, C.; KRAMS, M.; BECKER, I.; HARTMANN, A.; JAGLA, W.; GAUMANN, A. Shift in prevalence of HPV types in cervical cytology specimens in the era of HPV vaccination. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 601-610, 2016.

FUJIWARA, H.; YOKOTA, H.; MONK, B.; TREILLEUX, I.; DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M.; DAVIS, A.; KIM, J.-W.; MAHNER, S.; STANY, M.; PIGNATA, S.; RAY-COQUARD, I.; FUJIWARA, K. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) Consensus Review for Cervical Adenocarcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. November, p. S96–S101, 2014.

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; CHIOCCA, S.; TOMMASINO, M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **eCancer**, v.9, n.526, 9p, 2015.

GIEN, L. T.; BEAUCHEMIN, M. C.; THOMAS, G. Adenocarcinoma: A unique cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 1, p. 140–146, 2010.

GUO, L.; LIU, X.; WANG, L.; SUN, H.; HUANG, K.; LI, X.; TANG, F.; LI, S.; YUAN, X.; WANG, C. Outcome of International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIB Cervical Cancer From 2003 to 2012. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 25, n. 5, p. 910–918, 2015.

GONZAGA, C. M.; FREITAS-JUNIOR, R.; BARBARESCO, A. A.; MARTINS, E.; BERNARDES, B. T.; RESENDE, A. P. Cervical cancer mortality trends in Brazil: 1980-2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v.29, n.3, p.599-608, 2013.

GOODMAN, A. HPV testing as a screen for cervical cancer. **The BMJ**, v. 350, p. h2372–h2372, 2015.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

HELLMAN, K.; HELLSTROM, A. C.; PETTERSSON, B. F. Uterine cervix cancer treatment at Radiumhemmet: 90 years' experience. Time trends of age, stage and histopathology distribution. **Cancer Medicine**, v. 3, n. 2, p. 284-292, 2014.

HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P.; WU, T. C. Molecular epidemiology of human papillomavirus. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 107, n. 3, p. 198-217, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA, Brasil.). **Controle do câncer do colo do útero**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_nacional\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio). Acesso em 22 de setembro 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil.). **Estimativa 2016. Incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em 22 de setembro de 2016.

INTARAPHET, S.; KASATPIBAL, N.; SIRIAUNKGUL, S.; SOGAARD, M.; PATUMANOND, J.; KHUNAMORNONG, S.; CHANDACHAM, A.; SUPRASERT, P. Prognostic impact of histology in patients with cervical squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and small cell neuroendocrine carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 9, p. 5355-5360, 2013.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **Cancer Journal for Clinicians**, v.61, n.2, p.69-90, 2011.

KIETPEERAKOOL, C.; KLEEBKAOW, P.; SRISOMBOON, J. MINI-REVIEW Human Papillomavirus Genotype Distribution among Thai Women with High-Grade Cervical Intraepithelial Lesions and Invasive Cervical Cancer : a Literature Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 5153–5158, 2015.

LAU, Y. M.; CHEUNG, T. H.; YEO, W.; MO, F.; YU, M. Y.; LEE, K. M.; HO, W. C. S.; YEUNG, A. C. M.; LAW, P. T. Y.; CHAN, P. K. S. Prognostic

Implication of Human Papillomavirus Types and Species in Cervical Cancer Patients Undergoing Primary Treatment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 14 p., 2015.

LEE, S. M.; PARK, J. Y.; KIM, D. S. Wif1 Hypermethylation as Unfavorable Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancers with EGFR Mutation. **Molecules and Cells**, v. 36, p. 69-73, 2013.

LI, N.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v.128, p.927–935, 2011.

LIN, Y. W.; CHUNG, M. T.; LAI, H. C.; DE YAN, M.; SHIH, Y. L.; CHANG, C. C.; YU, M. H. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 12, p. 1665–1674, 2009.

LORINCZ, A. T. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 3, p. 293–305, 2014.

McGRAW, S. L.; FERRANTE, J. M. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v.5, n.4, p.744-752, 2014.

van der MEIDE, W. F.; SNELLENBERG, S.; MEIJER, C. J. L. M.; BAALBERGEN, a.; HELMERHORST, T. J. M.; VAN DER SLUIS, W. B.; SNIJDERS, P. J. F.; STEENBERGEN, R. D. M. Promoter methylation analysis of WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 1, p. 116–122, 2011.

MESHER, D.; CUSCHIERI, K.; HIBBITTS, S.; JAMISON, J.; SARGENT, A.; POLLOCK, K. G.; POWELL, N.; WILSON, R.; McCALL, F.; FIANDER, A.; SOLDAN, K. Type-specific HPV prevalence in invasive cervical cancer in the UK prior to national HPV immunisation programme: baseline for monitoring the effects of immunisation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n. 2, p. 135-140, 2015.

MOSCICKI, A. B. HPV-associated cancers: it's not all about the cervix. **Preventive Medicine**, v.53, suplement.1, p.S3-S4, 2011.

NAKAGAWA, J. T.; ESPINOSA, M. M.; BARBIERI, M.; SCHIRMER, J. Fatores associados ao câncer invasivo do colo do útero no estado de mato grosso. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 9, n. 4, p. 631–637, 2011.

NOWAKOWSKI, A.; CYBULSKI, M.; BUDA, I.; JANOSZ, I.; OLSZAK-WĄSIK, K.; BODZEK, P.; ŚLIWCZYŃSKI, A.; TETER, Z.; OLEJEK, A.; BARANOWSKI, W. Cervical Cancer Histology, Staging and Survival before and after Implementation of Organized Cervical Screening Program in Poland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 10 p., 2016.

de OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H. T. G.; CARVALHO, J. P.; LONGATTO-FILHO, A.; LEVI, J. E. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC Cancer**, v. 13, p. 357, 2013.

PASKA, A. V.; HUDLER, P. Aberrant methylation patterns in cancer : a clinical view. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 2, p. 161–176, 2015.

PERSSON, M.; ELFSTRÖM, K. M.; OLSSON, S. E.; DILLNER, J.; ANDERSSON, S. Minor Cytological Abnormalities and up to 7-Year Risk for Subsequent High-Grade Lesions by HPV Type. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 13 p., 2015.

RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L. C.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; AMARAL, R. G.; MAGALHÃES, A. V. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p.181–184, 2003.

RAMACHANDRAN, I.; THAVATHIRU, E.; RAMALINGAM, S.; NATARAJAN, G.; MILLS, W. K.; BENBROOK, D. M.; ZUNA, R.; LIGHTFOOT, S.; REIS, A.; ANANT, S.; QUEIMADO, L. Wnt inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. **Oncogene**, v. 31, p. 2725-2737, 2012.

RIBEIRO, A. A.; FIGUEIREDO ALVES, R. R.; COSTA, M. C.; VILLA, L. L.; ZEFERINO, L. C.; MAURICETTE DERCHAIN, S. F.; dos SANTOS CARNEIRO, M. A.; RABELO-SANTOS, S. H. Association between HPV types and species groups and cervical neoplasia from a high-risk area for cervical cancer, Goiânia, Brazil. **International Journal of Gynecological Pathology**, v.30, n.3, p.288-294, 2011.

RIBEIRO, A. A.; COSTA, M. C.; FIGUEIREDO ALVES, R. R.; VILLA, L. L.; SADDI, V.A.; dos SANTOS CARNEIRO, M. A.; ZEFERINO, L. C.; RABELO-SANTOS, S. H. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, v.10, n.16, 7p, 2015.

RODRIGUES, D. A.; PEREIRA, E. R.; OLIVEIRA, L. S. S.; SPECK, N. M. G.; GIMENO, S. G. A. Prevalência de atípias citológicas e infecção pelo papilomavírus humano de alto risco em mulheres indígenas Panará, povo indígena do Brasil Central. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 12, 2014.

SAAVEDRA, K. P.; BREBI, P. M.; ROA, J. C. S. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 13, 2012.

SALES, L. K. O. **Estudo da sobrevida e fatores prognósticos em mulheres com câncer do colo do útero no Rio Grande do Norte, Brasil.** Dissertação de mestrado. Mossoró, RN, 2015. Disponível em: <http://www.uern.br/controladepaginas/ppgss-alunos-regulares-2013>. Acesso em 27 de agosto de 2016.

de SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D.T.; KLAUSTERMEIER, J. E.; LLOVERAS, B.; TOUS, S.; FELIX, A.; BRAVO, L. E.; SHIN, H. R.; VALLEJOS, C. S.; de RUIZ, P. A.; LIMA, M.A.; GUIMERA, N.; CLAVERO, O.; ALEJO, M.; LLOMBART-BOSCH, A.; CHENG-YANG, C.; TATTI, S. A.; KASAMATSU, E.; ILJAZOVIC, E.; ODIDA, M.; PRADO, R.; SEOUD, M.; GRCE, M.; USUBUTUN, A.; JAIN, A.; SUAREZ, G. A.; LOMBARDI, L. E.; BANJO, A.; MENÉNDEZ, C.; DOMINGO, E. J.; VELASCO, J.; NESSA, A.; CHICHAREON, S. C.; QIAO, Y. L.; LERMA, E.; GARLAND, S. M.; SASAGAWA, T.; FERRERA, A.; HAMMOUDA, D.; MARIANI, L.; PELAYO, A.; STEINER, I.; OLIVA, E.; MEIJER, C. J.; AL-JASSAR, W. F.; CRUZ, E.; WRIGHT, T. C.; PURAS, A.; LLAVE, C. L.; TZARDI, M.; AGORASTOS, T.; GARCIA-BARRIOLA, V.; CLAVEL, C.; ORDI, J.; ANDÚJAR, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; SÁNCHEZ, G. I.; NOWAKOWSKI, A. M.; BORNSTEIN, J.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncology**, v.11, n.11, p.1048-1056, 2010.

SANKARANARAYANAN, R. Screening for Cancer in Low- and Middle-Income Countries. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. **Annals of Global Health**, v. 80, p. 412-417, 2014.

SCHLICHTER, M.; GUIDRY, J. Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 918–932, 2015.

SCULLY, R. E.; BONFIGLIO, T. A.; KURMAN, R. J.; SILVERBERG, S. G.; WILKINSON, E. J. **Histological typing of female genital tract tumors.** 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, p.36-49, 1994.

SIDERI, M.; CRISTOFORONI, P.; CASADIO, C.; BOVERI, S.; IGIDBASHIAN, S.; SCHIMITT, M.; GHEIT, T.; TOMMASINO, M. Distribution of human papilloma virus genotypes in invasive cervical cancer in Italy: a representative, single institution case series. **Vaccine**, v. 27, Supplementary 1, p. A30-33, 2009.

SIEGEL, E. M.; RIGGS, B. M.; DELMAS, A. L.; KOCH, A.; HAKAM, A.; BROWN, K. D. Quantitative DNA Methylation Analysis of Candidate Genes in Cervical Cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 16 p., 2015. e0122495.

SILVA-FILHO, A. L. Use of the prognosis markers in the treatment for the Invasive cervical carcinoma. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.9, p.468-73, 2009.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.

STEENBERGEN, R. D.; SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews. Cancer**, v.14, n.6, p.395-405, 2014.

TEKE, F.; YÖNEY, A.; TEKE, M.; ADANAŞ, G.; URAKÇI, Z.; TÜRKÇÜ, G.; EREN, B.; İNAL, A.; ÜNSAL, M. Evaluation of outcome and prognostic factors in 739 patients with uterine cervix carcinoma: a single institution experience. **Współczesna Onkologia**, v. 2, p. 130–136, 2015.

THULER, L. C. S.; AGUIAR, S. S.; BERGMANN, A. Determinantes do diagnóstico em estadió avançado do câncer do colo do útero no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 6, 2014.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v.26, p. 13-21, 2014.

TRIFA, F.; KARRAY-CHOUAYEKH, S.; JMAL, E.; JMAA, Z. Ben; KHABIR, A.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; FRIKHA, M.; DAOUD, J.; MOKDAD-GARGOURI, R. Loss of *WIFI* and Wnt5a expression is related to aggressiveness of sporadic breast cancer in Tunisian patients. **Tumor Biology**, v. 34, n. 3, p. 1625–1633, 2013.

VINH-HUNG, V.; BOURGAIN, C.; VLASTOS, G.; CSERNI, G.; RIDDER, M. D.; STORME, G.; VLASTOS, A. T. Prognostic value of histopathology and trends in cervical cancer: a SEER population study. **BMC Cancer**, v. 7, n. 164, 13 p., 2007.

VINK, M. A.; BOGAARDS, J. A.; VAN KEMENADE, F. J.; DE MELKER, H. E.; MEIJER, C. J.; BERKHOF, J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. **American Journal Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1161-1169, 2013.

WAGNER, M.; BENNETTS, L.; PATEL, H.; WELNER, S.; de SANJOSE, S.; WEISS, T. W. Global availability of data on HPV genotype-distribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2015.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v.189, n.1, p.12-9, 1999.

WEND, P.; FANG, L.; ZHU, Q.; SCHIPPER, J. H.; LODDENKEMPER, C.; KOSEL, F.; BRINKMANN, V.; ECKERT, K.; HINDERSIN, S.; HOLLAND, J. D.; LEHR, S.; KAHN, M.; ZIEBOLD, U.; BIRCHMEIER, W. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling induces MLL to create epigenetic changes in salivary gland tumours. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 14, p. 1977–89, 2013.

WHITE, E. a.; KRAMER, R. E.; TAN, M. J. a.; HAYES, S. D.; HARPER, J. W.; HOWLEY, P. M. Comprehensive Analysis of Host Cellular Interactions with Human Papillomavirus E6 Proteins Identifies New E6 Binding Partners and Reflects Viral Diversity. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13174–13186, 2012.

WOODMAN, C.B.J.; COLLINS, S.I.; YOUNG, L.S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, p. 8-10, 2007.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. **Declaration of Helsinque**. França, 2013. Disponível em: <http://www.wma.net/en/20activities/10ethics/10helsinki/DoH-Oct2013-JAMA.pdf>. Acesso em 27 de agosto de 2016.

XIE, X.; SONG, K.; CUI, B.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, B.; YANG, X.; KONG, B. Clinical and Pathological Factors Related to the Prognosis of Chinese Patients with Stage I b To II b Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 5505–5510, 2012.

YANG, L.; YANG, H.; WU, K.; SHI, X.; MA, S.; SUN, Q. Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South West China. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.11, p.1926-1936, 2014.

ZAMPRONHA, R. A.; FREITAS-JUNIOR, R.; MURTA, E. F.; MICHELIN, M. A.; BARBARESCO, A. A.; ADAD, S. J.; OLIVEIRA, A. M.; RASSI, A. B.; OTON, G. J. B. Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage I cervical cancer. **Clinics**, v. 68, n. 6, p. 809-814, 2013.

ZARCHI, M. K.; AKHAVAN, A.; FALLAHZADEH, H.; GHOLAMI, H.; DEGHANI, A.; TEIMOORI, S. Outcome of Cervical Cancer in Iranian Patients According to Tumor Histology, Stage of Disease and Therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p.1289-1291, 2010.

ZEFERINO, L. C. O desafio de reduzir a mortalidade por câncer do colo do útero.  
**Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 5, p. 213–215, 2008.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1: parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER EM GOIÁS -



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise do status dos genes CADM-1, SOX17, DKK3, SFRP2 e WIF-1 e tipos de HPV em câncer cervical e associação com a origem e o estadiamento da neoplasia cervical.

**Pesquisador:** Silvia Helena Rabelo dos Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 35784014.5.3001.0031

**Instituição Proponente:** Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovação com recomendações

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

GOIANIA, 11 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Adriano de Paula**  
**(Coordenador)**

## 9.2. Anexo 2: manuscrito a ser submetido

### **STAGING, HPV GENOTYPES AND *WIFI* METHYLATION IN CERVICAL CANCER: ASSOCIATIONS WITH PROGNOSIS AND SURVIVAL**

**ALMEIDA-CARVALHO, K. P.; SADDI, V. A.; TERMINI, L.; VILLA, L. L.; SEGATI, K. D.; ZEFERINO, L. C.**

#### **INTRODUCTION**

Cervical cancer is considered a major public health issue. For 2012 it was estimated the occurrence of 527,000 new cases of this cancer in the world. This type is the third most frequently diagnosed and the fourth cause of cancer death among women. It represents 9% of total new cases and 8% of total cancer deaths among women (JEMAL et al., 2011). The cervical cancer most common histological type is squamous cell carcinoma, which represents 75% to 90% of the cases. The endocervical adenocarcinoma occur in 11% to 25% of the cases (SCHLICHTE; GUIDRY, 2015; NOWAKOWSKI et al., 2016).

Tumor staging is important to evaluate prognosis as survival varies according to the cancer dissemination level (NCI, 2015). The TNM system, established by International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), is the most widely used tumor staging system, which stages varies from I to IV and can be subdivided into A and B to express the neoplastic evolution level (FIGO, 2009). The cervical cancer five-year survival is about 75% and it is higher in stages I/II without pelvic lymph nodes involvement (XIE et al., 2012). In Brazil, survival was 93.5% and 100% with the cancer diagnosed in stages I and II, respectively (NAKAGAWA et al., 2011).

The most prevalent genotypes of HPV are HPV 16 and HPV 18. Data indicates HPV 16 is the most prevalent in squamous cell carcinoma, accounting for 50% to 60% of the cases while HPV 18 occurs in 10% to 20% of the cases. However, in adenocarcinoma HPV 18 and HPV 16 prevalence is reversed: 40 % to 60% and 31% to 53%, respectively (de SANJOSE et al., 2010; LI et al., 2011).

Aberrant methylation of promoter regions is an important mechanism of gene function loss in cancer. As this is an early event in carcinogenesis and it is observed in precursor lesions of many types of cancer, DNA methylation can be a potential early

diagnosis biomarker (LORINCZ, 2014). Wnt inhibitory factor-1 (*WIF1*) is a secreted protein that binds the oncogenic pathway Wnt and antagonizes its activities. It has been described as an epigenetic silencing target in some cancers, as breast, lung, prostate and cervical confirming its tumor suppressive role (DELMAS et al., 2011; van der MEIDE et al., 2011; TRIFA et al., 2013). In cervical cancer *WIF1* methylation is histotype-independent and it is not associated with poor survival as this is an early event in cervical carcinogenesis (van der MEIDE et al., 2011; SIEGEL et al., 2015).

There are few studies evaluating tumor staging, HPV genotypes and *WIF1* methylation in cervical cancer and their association with prognosis and survival. Thus, the aim of this study was to evaluate tumor staging, HPV genotypes and *WIF1* methylation in cervical cancer and to test association of these variables with age, prognosis and survival.

## MATERIALS AND METHODS

This was a retrospective cohort study constituted by women diagnosed with invasive squamous cell carcinoma (SCC) and invasive endocervical adenocarcinoma (ADC). Araujo Jorge Hospital (Goiania, Brazil) Ethics Committee approved this study.

It was included 95 cases obtained in Araujo Jorge Hospital: 73 of invasive squamous cell carcinoma and 22 of invasive endocervical adenocarcinoma. The obtaining flowchart of the total cases included in this study is shown in figure 1.

After selection, DNA was extracted from paraffin-embedded biopsies using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v e pH 8,0 – Invitrogen®, EUA). HPV detection and genotyping were realized using the kit INNO- LiPA HPV GENOTYPING EXTRA® (Innogenetics™), following all manufactures' instructions.

Methylation of *WIF1* gene was evaluated by methylation-specific PCR (MSP). First, DNA was bisulfite treated with EpiTect Bisulfite® (Qiagen®, EUA) following all manufactures' instructions. Then it was proceeded the MSP according to van der Meide et al. (2011), including the primers.

Statistical analysis was performed using SPSS (8.2). Odds Ratio was used to calculate statistical association of tumor staging, HPV genotypes and *WIF1* methylation with age, prognosis and survival. The calculation of survival used the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare means of survival and prognostic factors. A value of  $p < 0.05$  was considered statically significant.

## RESULTS

The 95 women's ages at the diagnosis varied from 26 to 91 years and the mean and median was 51 years. SCC and ADC occurred in 76.8% and 23.2% of the cases, respectively. Tumor staging I/II were observed in 69.9% and 77.3% of the SCC and ADC cases, respectively (data not shown).

Total prevalence of HPV was 96.8%. HPV 16 prevalence was 72.6% in SCC and 59.2% in ADC. In both histological types, this genotype was more frequently detected in stages I/II: 75.5% of SCC and 69.2% of ADC. HPV 18 prevalence in ADC was 13.6% and in SCC was 6.9%. In SCC, 60% of cases positive to HPV 18 were at stages III/IV, and in ADC 100% of cases positive to this genotype were at stages I/II. Other genotypes, such as HPV 33, 45, 52, 31 and 58 had similar results to HPV 16. The three samples HPV-negative had diagnosis of ADC (table 1).

*WIFI* methylation frequency was 45.3%. Table 2 shows that *WIFI* methylation frequency in SCC was 42.5% and in ADC was 54.5%. In both histological types, *WIFI* methylation frequency was higher in stages I/II (74.2% and 83.3%, respectively).

At the last date of five-year follow-up of women included in this study, the death rate was 15.8%. Women alive without signs of disease represented 54.7% of the cases. Among women with SCC and alive without disease signs until the last date of follow-up, 86.5% had tumor staging I/II, 100% and 45.9% were HPV-positive and positive for *WIFI* methylation, respectively. Regarding to women with ADC and alive without disease signs until the last date of follow-up, 93.3% had tumor staging I/II, 80% and 60% were HPV-positive and positive for *WIFI* methylation, respectively (table 3).

Tumor staging III/IV was associated with worse prognosis, defined as death by disease or alive with disease signs at the end of follow-up. Histological type, HPV infection and *WIFI* methylation were not associated with cervical cancer prognosis (table 4).

Table 5 shows that women aged above 51 years old had more chances of having tumor staging III/IV at diagnosis. Age from 50 to 60 years old showed a protector effect regarding higher stages, meaning they were less likely to be diagnosed with cervical cancer in higher stages. This effect was not observed in ages <40 or >70 years old (data not shown). This data does not conflict with the results in table 5, because women aged >70 years old were included in the group of women aged above 51 years old. According to natural history of this cancer and the results of this study, these women (>70 years

old) are more likely being diagnosed in higher stages. No association was found between age above 51 years old and HPV 16/18 infection or positive *WIFI* methylation.

Five-year overall survival was 79.1%. It was significantly higher in cases with tumor staging I/II. No significant difference in overall survival was observed when analyzed with age, histological type, HPV infection or *WIFI* methylation (figure 2).

## DISCUSSION

Women with tumor staging III/IV were more likely having worse prognosis and lower survival. Age, histological type, HPV 16/18 infection or positive *WIFI* methylation were not associated with worse prognosis or lower survival.

Five-year overall survival was 79.1%. In developed countries, such as United States, Australia, France and England, overall survival ranges from 60% to 70% (NAKAGAWA et al, 2011). At the date of the last five-year follow-up, women alive without disease signs represented 54.7% of the cases. Women with cervical cancer in stages III/IV were more likely having worse prognosis when compared to those who had tumor staging I/II (OR = 7,32;  $p = 0,000$ ). Besides, survival of women diagnosed in stages I/II were significantly higher than those who had tumor staging III/IV ( $p = 0,001$ ). Previous studies showed worse prognosis in women diagnosed with advanced stage of cervical cancer (ZARCHI et al., 2010; GUO et al., 2015). Zarchi et al. (2010) noticed higher survival in cases in stage IIB compared to those in stage IIIB. These results enhance the fact that cervical cancer prognosis is better when it is diagnosed in less advanced stages. The main goal of well-organized screening is early detection, when it is still in pre-invasive phases (SANKARANARAYANAN, 2014) – this would be the ideal situation. Although, when it is not possible, early stages diagnosis shows high probability of disease-free survival.

Among the 95 women composing this study, those aged > 51 years old were more likely being diagnosed with advanced stage cancer (OR = 5,92;  $p = 0,0006$ ). This data supports natural disease history, which evolves slowly and takes an average of 10 to 30 years to progress from an initial lesion (which occurs around age 20 to 30 years old) to invasive form (VINK et al.; 2013; STEENBERGEN et al., 2014). In Brazil, a cross-sectional study including 37.638 cervical cancer cases showed the proportion of women diagnosed at advanced disease stages, with a predominance of tumor stage III, was higher than those diagnosed at initial stages. Therefore, it was observed that this cancer is still lately diagnosed in Brazil (THULER; AGUIAR; BERGMANN, 2014). In the

present study, 71.6% of the cases were detected in stages I/II, what may have contributed for high overall survival (79.1%) and better prognosis.

SCC represented 76.8% of the cases in this study. de Sanjose et al. (2010) conducted a retrospective study including 8977 cervical cancer samples from 38 European countries, of which 91.9% corresponded to SCC. In China, among 255 cases 85.5% were SCC (XIE et al., 2012). In Turkey, this rate was 87.8% (TEKE et al., 2015) and in Brazil, 83.7% (de OLIVEIRA et al., 2013). In the present study, ADC were 23.3% of the cases.

Regarding to prognosis, data is controversial. Some studies showed survival similarity between SCC and ADC (HELLMAN; HELLSTROM; PETTERSSON, 2014; NOWAKOWSKI et al., 2016). However, other studies showed that at the same stage, ADC had worse prognosis, differing in five-year survival from 10% to 20% compared to SCC (GIEN; BEAUCHEMIN; THOMAS, 2010; NOWAKOWSKI et al., 2016). In the present study, ADC was not associated with worse prognosis ( $p = 0.15$ ) or lower survival ( $p = 0.538$ ) and this result was similar to those found by Xie et al. (2012) and Nowakowski et al. (2016). The difference between these two histological types appears as tumor staging enhances (GIEN; BEAUCHEMIN; THOMAS, 2010). As most cases of the present study were SCC in stages I/II, it was not possible to notice significant differences in survival between these two histological types of cervical cancer.

Worldwide, HPV 16 and 18 are responsible for approximately 70% of cervical cancers (WAGNER et al., 2015). de Sanjose et al. (2010) and Li et al. (2011) observed prevalence of 71% and 72.5%, respectively, of these two genotypes in invasive cervical cancers. In Thailand, this number was greater than 60% (KIETPEERAKOOL; KLEEBKAOW; SRISOMBOON, 2015) and in Brazil and China, greater than 90% (de OLIVEIRA et al., 2013; YANG et al., 2014). Other oncogenic genotypes, such as HPV 31, 33, 45, 52 and 58, along with HPV 16 and 18, have been detected in 90% of the invasive cervical cancers and they are targeted by the 9-valent vaccine, already commercialized in some countries (WAGNER et al., 2015). These seven HPV genotypes were the most prevalent in the present study.

Persistent HPV infection is essential to development of cervical cancer and HPV 16 and 18 had the major carcinogenic potential (WALBOOMERS et al., 1999; de SANJOSE et al., 2010; de OLIVEIRA et al., 2013). Although the oncogenic potential of these two genotypes is well established, recent studies observed they were not associated with worse prognosis or lower survival in women with invasive cervical

cancer ZAMPRONHA et al., 2013; CUSCHIERI et al., 2014; LAU et al., 2015). In the present study, no association was found between HPV 16/18 infection and worse prognosis ( $p = 0.24$ ) or lower survival ( $p = 0.434$ ).

Some studies reported that women infected by HPV 16/18 were more likely developing severe precursor lesions compared to those infected by other HPV genotypes (EINSTEIN et al., 2011; SIDERI et al., 2011). Besides, Cuschieri et al. (2014) noticed that cancers associated with HPV 16/18 did not confer worse survival compared to cancers associated with other genotypes. Thus, it is believed HPV 16/18 are associated to occurrence of severe precursor lesions in younger women compared to other HPV genotypes (COUPÉ et al., 2008; SIDERI et al., 2011; PERSSON et al., 2015). It is possible that, after the cancer is established, its evolution into higher stages and consequent worse prognosis and survival is independent of HPV genotype.

The frequency of *WIFI* methylation was 45.3%. Positivity of *WIFI* methylation among SCC and ADC cases was 54.5% and 42.5%, respectively, and it was 48.5% in stages I/II and 37% in stages III/IV. van der Meide et al. (2011) described that *WIFI* methylation was histotype-independent and it was observed in 71% of ADC and 54% of SCC cases. Lee et al. (2013) noticed that this variable was more frequent in stage I lung cancer patients and it was not associated with survival. Ramachandran et al. (2014) observed that *WIFI* methylation occurs in salivary glands precursor lesions, what indicates higher risk of progression from benign to malignant tumor. It is well known that *WIFI* epigenetic silencing is an early event in cervical cancer carcinogenesis (SIEGEL et al., 2015). Thus, it might be important to initiation and progression of precursor lesions, but it does not influence the cancer evolution to higher stages. Even considering the small number of cases in the present study, it may be possible that is the reason why the *WIFI* methylation was not associated with worse prognosis ( $p = 0.41$ ) or lower survival ( $p = 0.51$ ).

One of the limitations of this study was the small number of ADC cases, what might had influence statistical analysis, contributing for no association between histological type and worse prognosis and lower survival. Other one was that DNA extracted from paraffin-embedded biopsies did not resulted enough quantity that would enables quantify the *WIFI* methylation so it was possible to compare with other studies.

In conclusion, worse prognosis and lower survival were determined by tumor staging III/IV and it was not associated with histological type ADC, HPV 16/18 infection and positive *WIFI* methylation. It is possible that these results would be

different if it was included precursor lesions cases as HPV 16/18 infection and *WIFI* methylation appears to be determinant in its development in less time.

## REFERENCES

1. COUPÉ, V. M.; BERKHOF, J.; BULKMANS, N. W.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Age-dependent prevalence of 14 high-risk HPV types in the Netherlands: implications for prophylactic vaccination and screening. **British Journal of Cancer**, v. 98, p. 646-651, 2008.
2. CUSCHIERI, K.; BREWSTER, D. H.; GRAHAM, C.; NICOLL, S.; WILLIAMS, A. R. W.; MURRAY, G. I.; MILLAN, JOHANNESSEN, D.; HARDIE, I. A.; CUBIE, H. A. Influence of HPV type on prognosis in patients diagnosed with invasive cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 135, p. 2721-2726, 2014.
3. DELMAS, A. L.; RIGGS, B. M.; PARDO, C. E.; DYER, L. M.; DARST, R. P.; IZUMCHENKO, E. G.; MONROE, M.; HAKAM, A.; KLADDE, M. P.; SIEGEL, E. M.; BROWN, K. D. is a frequent target for epigenetic silencing in squamous cell carcinoma of the cervix. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 11, p. 1625–1633, 2011.
4. EINSTEIN, M. H.; GARCIA, F. A.; MITCHELL, A. L.; DAY, S. P. Age-stratified performance of the Cervista HPV 16/18 genotyping test in women with ASC-US cytology. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, p. 1185-1189, 2011.
5. FIGO: The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas. **Gynecology Oncology**, v.115, p.325–328, 2009.
6. FUJIWARA, H.; YOKOTA, H.; MONK, B.; TREILLEUX, I.; DEVOUASSOUX-SHISHEBORAN, M.; DAVIS, A.; KIM, J.-W.; MAHNER, S.; STANY, M.; PIGNATA, S.; RAY-COQUARD, I.; FUJIWARA, K. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) Consensus Review for Cervical Adenocarcinoma. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. November, p. S96–S101, 2014.

7. GIEN, L. T.; BEAUCHEMIN, M. C.; THOMAS, G. Adenocarcinoma: A unique cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 1, p. 140–146, 2010.
8. GUO, L.; LIU, X.; WANG, L.; SUN, H.; HUANG, K.; LI, X.; TANG, F.; LI, S.; YUAN, X.; WANG, C. Outcome of International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage IIB Cervical Cancer From 2003 to 2012. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 25, n. 5, p. 910–918, 2015.
9. HELLMAN, K.; HELLSTROM, A. C.; PETTERSSON, B. F. Uterine cervix cancer treatment at Radiumhemmet: 90 years' experience. Time trends of age, stage and histopathology distribution. **Cancer Medicine**, v. 3, n. 2, p. 284-292, 2014.
10. JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **Cancer Journal for Clinicians**, v.61, n.2, p.69-90, 2011.
11. KIETPEERAKOOL, C.; KLEEBKAOW, P.; SRISOMBOON, J. MINI-REVIEW Human Papillomavirus Genotype Distribution among Thai Women with High-Grade Cervical Intraepithelial Lesions and Invasive Cervical Cancer: a Literature Review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, p. 5153–5158, 2015.
12. LAU, Y. M.; CHEUNG, T. H.; YEO, W.; MO, F.; YU, M. Y.; LEE, K. M.; HO, W. C. S.; YEUNG, A. C. M.; LAW, P. T. Y.; CHAN, P. K. S. Prognostic Implication of Human Papillomavirus Types and Species in Cervical Cancer Patients Undergoing Primary Treatment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 14 p., 2015.
13. LEE, S. M.; PARK, J. Y.; KIM, D. S. Wif1 Hypermethylation as Unfavorable Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancers with EGFR Mutation. **Molecules and Cells**, v. 36, p. 69-73, 2013.
14. LI, N.; FRANCESCHI, S.; HOWELL-JONES, R.; SNIJDERS, P. J. F.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v.128, p.927–935, 2011.

15. LORINCZ, A. T. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 14, n. 3, p. 293–305, 2014.
16. van der MEIDE, W. F.; SNELLENBERG, S.; MEIJER, C. J. L. M.; BAALBERGEN, a.; HELMERHORST, T. J. M.; VAN DER SLUIS, W. B.; SNIJDERS, P. J. F.; STEENBERGEN, R. D. M. Promoter methylation analysis of WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 1, p. 116–122, 2011.
17. NAKAGAWA, J. T.; ESPINOSA, M. M.; BARBIERI, M.; SCHIRMER, J. Fatores associados ao câncer invasivo do colo do útero no estado de mato grosso. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 9, n. 4, p. 631–637, 2011.
18. NOWAKOWSKI, A.; CYBULSKI, M.; BUDA, I.; JANOSZ, I.; OLSZAK-WĄSIK, K.; BODZEK, P.; ŚLIWCZYŃSKI, A.; TETER, Z.; OLEJEK, A.; BARANOWSKI, W. Cervical Cancer Histology, Staging and Survival before and after Implementation of Organised Cervical Screening Programme in Poland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 10 p., 2016.
19. de OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H. T. G.; CARVALHO, J. P.; LONGATTO-FILHO, A.; LEVI, J. E. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. **BMC cancer**, v. 13, p. 357, 2013.
20. PERSSON, M.; ELFSTRÖM, K. M.; OLSSON, S. E.; DILLNER, J.; ANDERSSON, S. Minor Cytological Abnormalities and up to 7-Year Risk for Subsequent High-Grade Lesions by HPV Type. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 13 p., 2015.
21. RAMACHANDRAN, I.; THAVATHIRU, E.; RAMALINGAM, S.; NATARAJAN, G.; MILLS, W. K.; BENBROOK, D. M.; ZUNA, R.; LIGHTFOOT, S.; REIS, A.; ANANT, S.; QUEIMADO, L. Wnt inhibitory factor 1

induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis in vivo. **Oncogene**, v. 31, p. 2725-2737, 2012.

22. de SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D.T.; KLAUSTERMEIER, J. E.; LLOVERAS, B.; TOUS, S.; FELIX, A.; BRAVO, L. E.; SHIN, H. R.; VALLEJOS, C. S.; de RUIZ, P. A.; LIMA, M.A.; GUIMERA, N.; CLAVERO, O.; ALEJO, M.; LLOMBART-BOSCH, A.; CHENG-YANG, C.; TATTI, S. A.; KASAMATSU, E.; ILJAZOVIC, E.; ODIDA, M.; PRADO, R.; SEOUD, M.; GRCE, M.; USUBUTUN, A.; JAIN, A.; SUAREZ, G. A.; LOMBARDI, L. E.; BANJO, A.; MENÉNDEZ, C.; DOMINGO, E. J.; VELASCO, J.; NESSA, A.; CHICHAREON, S. C.; QIAO, Y. L.; LERMA, E.; GARLAND, S. M.; SASAGAWA, T.; FERRERA, A.; HAMMOUDA, D.; MARIANI, L.; PELAYO, A.; STEINER, I.; OLIVA, E.; MEIJER, C. J.; AL-JASSAR, W. F.; CRUZ, E.; WRIGHT, T. C.; PURAS, A.; LLAVE, C. L.; TZARDI, M.; AGORASTOS, T.; GARCIA-BARRIOLA, V.; CLAVEL, C.; ORDI, J.; ANDÚJAR, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; SÁNCHEZ, G. I.; NOWAKOWSKI, A. M.; BORNSTEIN, J.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **Lancet Oncology**, v.11, n.11, p.1048-1056, 2010.
23. SANKARANARAYANAN, R. Screening for Cancer in Low- and Middle-Income Countries. Icahn School of Medicine at Mount Sinai. **Annals of Global Health**, v. 80, p. 412-417, 2014.
24. SCHLICHTER, M.; GUIDRY, J. Current Cervical Carcinoma Screening Guidelines. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 5, p. 918–932, 2015.
25. SIDERI, M.; CRISTOFORONI, P.; CASADIO, C.; BOVERI, S.; IGIDBASHIAN, S.; SCHIMITT, M.; GHEIT, T.; TOMMASINO, M. Distribution of human papilloma virus genotypes in invasive cervical cancer in Italy: a representative, single institution case series. **Vaccine**, v. 27, Supplementary 1, p. A30-33, 2009.

26. SIEGEL, E. M.; RIGGS, B. M.; DELMAS, A. L.; KOCH, A.; HAKAM, A.; BROWN, K. D. Quantitative DNA Methylation Analysis of Candidate Genes in Cervical Cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 16 p., 2015. e0122495.
27. STEENBERGEN, R. D.; SNIJDERS, P. J. F.; HEIDEMAN, D. A. M.; MEIJER, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nature Reviews. Cancer**, v.14, n.6, p.395-405, 2014.
28. TEKE, F.; YÖNEY, A.; TEKE, M.; ADANAŞ, G.; URAKÇI, Z.; TÜRKÇÜ, G.; EREN, B.; İNAL, A.; ÜNSAL, M. Evaluation of outcome and prognostic factors in 739 patients with uterine cervix carcinoma: a single institution experience. **Współczesna Onkologia**, v. 2, p. 130–136, 2015.
29. THULER, L. C. S.; AGUIAR, S. S.; BERGMANN, A. Determinantes do diagnóstico em estadio avançado do câncer do colo do útero no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 6, 2014.
30. TRIFA, F.; KARRAY-CHOUAYEKH, S.; JMAL, E.; JMAA, Z. Ben; KHABIR, A.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; FRIKHA, M.; DAOUD, J.; MOKDAD-GARGOURI, R. Loss of *WIF1* and *Wnt5a* expression is related to aggressiveness of sporadic breast cancer in Tunisian patients. **Tumor Biology**, v. 34, n. 3, p. 1625–1633, 2013.
31. VINK, M. A.; BOGAARDS, J. A.; VAN KEMENADE, F. J.; DE MELKER, H. E.; MEIJER, C. J.; BERKHOF, J. Clinical progression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: estimating the time to preclinical cervical cancer from doubly censored national registry data. **American Journal Epidemiology**, v. 178, n. 7, p. 1161-1169, 2013.
32. WAGNER, M.; BENNETTS, L.; PATEL, H.; WELNER, S.; de SANJOSE, S.; WEISS, T. W. Global availability of data on HPV genotype-distribution in cervical, vulvar and vaginal disease and genotype-specific prevalence and incidence of HPV infection in females. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2015.

33. WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v.189, n.1, p.12-9, 1999.
34. XIE, X.; SONG, K.; CUI, B.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, B.; YANG, X.; KONG, B. Clinical and Pathological Factors Related to the Prognosis of Chinese Patients with Stage I b To II b Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 5505–5510, 2012.
35. YANG, L.; YANG, H.; WU, K.; SHI, X.; MA, S.; SUN, Q. Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South West China. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.11, p.1926-1936, 2014.
36. ZAMPRONHA, R. A.; FREITAS-JUNIOR, R.; MURTA, E. F.; MICHELIN, M. A.; BARBARESCO, A. A.; ADAD, S. J.; OLIVEIRA, A. M.; RASSI, A. B.; OTON, G. J. B. Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage I cervical cancer. **Clinics**, v. 68, n. 6, p. 809-814, 2013.
37. ZARCHI, M. K.; AKHAVAN, A.; FALLAHZADEH, H.; GHOLAMI, H.; DEHGHANI, A.; TEIMOORI, S. Outcome of Cervical Cancer in Iranian Patients According to Tumor Histology, Stage of Disease and Therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p.1289-1291, 2010.

## Tables and Figures

**Table 1.** Distribution of HPV genotypes according to histological type and tumor staging

HISTOLOGICAL TYPE AND TUMOR STAGING	HPV GENOTYPES (SINGLE OR MULTIPLE INFECTIONS)			
	16 n (%)	18 n (%)	Other n (%)	Negative n (%)
<b>Squamous cell carcinoma</b>				
<b>I/II</b>	40 (75.5)	2 (40)	9 (60)	0
<b>III/IV</b>	13 (24.5)	3 (60)	6 (40)	0
<b>Total</b>	53 (72.6)	5 (6.9)	15 (20.5)	0
<b>Endocervical adenocarcinoma</b>				
<b>I/II</b>	9 (69.2)	3 (100)	3 (100)	2 (66.7)
<b>III/IV</b>	4 (30.8)	0	0	1 (33.3)
<b>Total</b>	13 (59.2)	3 (13.6)	3 (13.6)	3 (13.6)

**Table 2.** Distribution of *WIFI* methylation positive and negative cases according to histological type and tumor staging

<b>HISTOLOGICAL TYPE AND TUMOR STAGING</b>	<b><i>WIFI</i> METHYLATION</b>	
	<b>Positive</b>	<b>Negative</b>
<b>Squamous cell carcinoma</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>I/II</b>	23 (74.2)	28 (66.7)
<b>III/IV</b>	8 (25.8)	14 (33.3)
<b>Total</b>	31 (42.5)	42 (57.5)
<b>Endocervical adenocarcinoma</b>		
<b>I/II</b>	10 (83.3)	7 (70)
<b>III/IV</b>	2 (16.7)	3 (30)
<b>Total</b>	12 (54.5)	10 (45.5)

**Table 3.** Cases' distribution according to histological type, tumor staging, HPV infection and *WIFI* methylation until the last five-year follow-up

<b>Squamous cell carcinoma</b>			
	<b>Alive without disease signs</b>	<b>Alive with disease signs</b>	<b>Death</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Stages I/II</b>	32 (86.5)	13 (52)	6 (54.5)
<b>Stages III/IV</b>	5 (13.5)	12 (48)	5 (45.4)
<b>Total</b>	37 (50.7)	25 (34.3)	11 (15)
<b>HPV infection positive</b>	37 (100)	25 (100)	11 (100)
<b>HPV infection negative</b>	0	0	0
<b>Total</b>	37 (50.7)	25 (34.3)	11 (15)
<b><i>WIFI</i> methylation positive</b>	17 (45.9)	6 (24)	8 (72.7)
<b><i>WIFI</i> methylation negative</b>	20 (54.1)	19 (76)	3 (27.3)
<b>Total</b>	37(50.7)	25 (34.3)	11 (15)

Table 3. Continuation

<b>Endocervical adenocarcinoma</b>			
	<b>Alive without disease signs</b>	<b>Alive with disease signs</b>	<b>Death</b>
<b>Stages I/II</b>	14 (93.3)	3 (100)	0
<b>Stages III/IV</b>	1 (6.7)	0	4 (100)
<b>Total</b>	15 (68.2)	3 (13.6)	4 (18.2)
<b>HPV infection positive</b>	12 (80)	3 (100)	4 (100)
<b>HPV infection negative</b>	3 (20)	0	0
<b>Total</b>	15 (68.2)	3 (13.6)	4 (18.2)
<b>WIFI methylation positive</b>	9 (60)	2 (66.7)	1 (25)
<b>WIFI methylation negative</b>	6 (40)	1 (33.3)	3 (75)
<b>Total</b>	15 (68.2)	3 (13.6)	4 (18.2)

**Table 4.** Association between worse prognosis and tumor staging, histological type, HPV infection and *WIFI* methylation

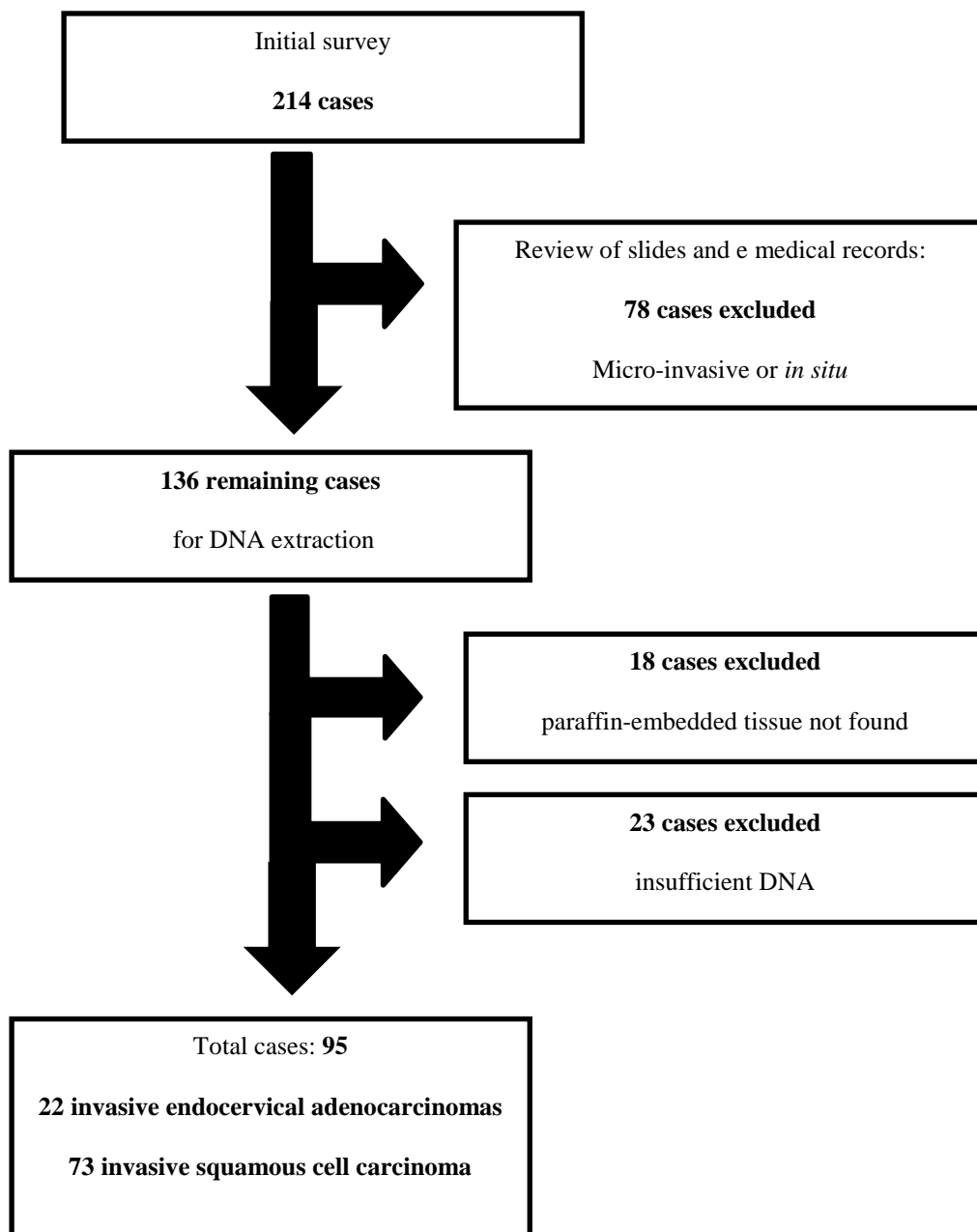
Variables	Worse prognosis	
	OR (95% CI)	<i>P</i>
Tumor staging	7.32 (2.35 – 23.83)	0.000
Histological type	0.48 (0.15 – 1.45)	0.15
HPV infection	3.52 (0.35 – 85.92)	0.24
<i>WIFI</i> methylation	0.65 (0.27 – 1.60)	0.41

OR: odds ratio; CI: confidence interval. *p*-value < 0.05 was considered statically significant. Worse prognosis was constituted by cases in which patient's evolution was "alive with disease signs" or "death" at the last five-year follow-up. Prognosis' negative control was cases in which patient's evolution was "alive without disease signs" at the last five-year follow-up.

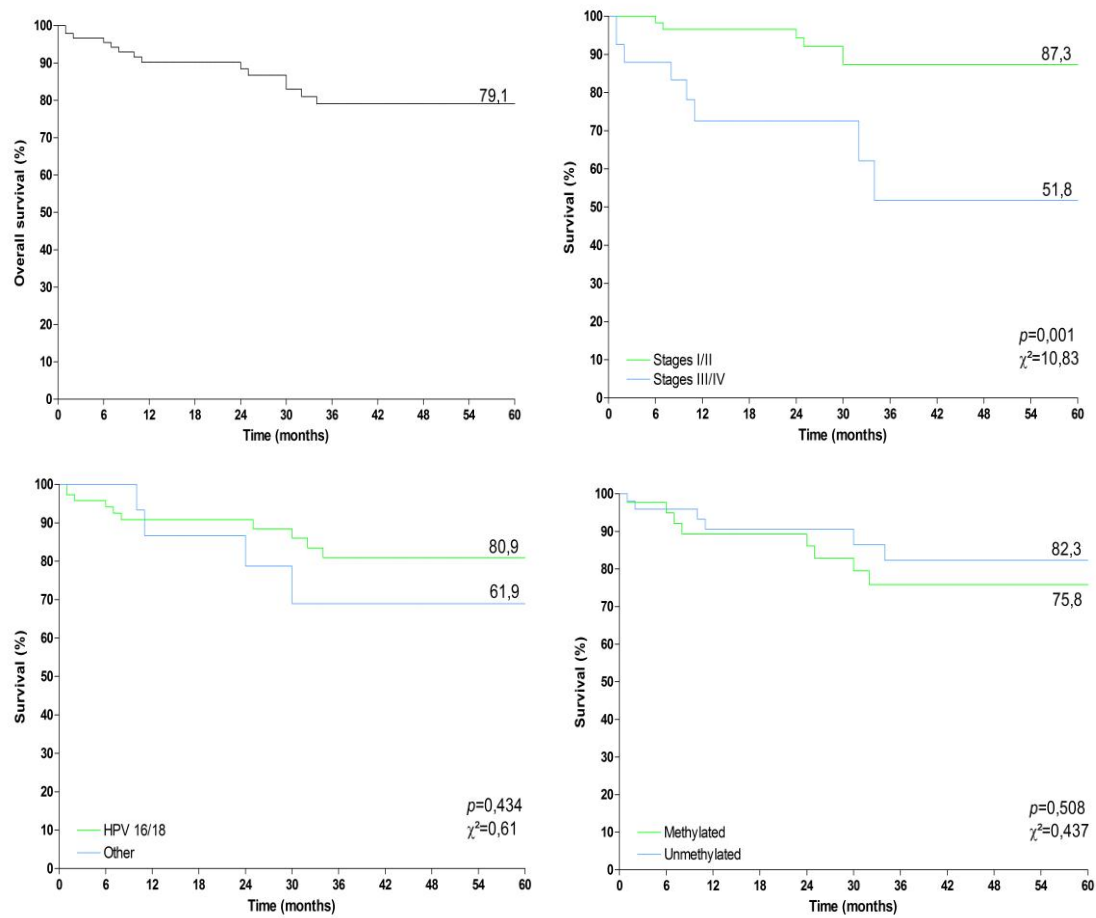
**Table 5.** Association between tumor staging, HPV genotypes, *WIFI* methylation and age

Variables	≥ 51 years	< 51 years	OR (95% CI)	<i>P</i>
	N	N		
<b>Tumor staging</b>				
III/IV	22	5	5.92	0.0006
I/II	29	39	(1.82 – 20.39)	
<b>HPV genotypes</b>				
HPV 16/18	38	36	1.54	0.39
Other	13	8	(0.52 – 4.66)	
<b><i>WIFI</i> methylation</b>				
Positive	23	20	0.99	0.97
Negative	28	24	(0.40 – 2.40)	

OR: odds ratio; CI: confidence interval. *p*-value < 0.05 was considered statically significant

**Figure 1.** Obtaining flowchart of the total cases

**Figure 2.** Overall five-year survival and five-year survival related to tumor staging, HPV genotypes and *WIF1* methylation curves



The calculation of survival used the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare means of survival and prognostic factors. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.