

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**PERFIL DE METILAÇÃO  
DAS ILHAS CpG DOS GENES  
*CDH1, TIMP3 E MGMT*  
COMO FATORES PREDITORES  
PARA RECIDIVA DE  
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL  
EM MULHERES INFECTADAS E  
NÃO INFECTADAS PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

**CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI**

**Belo Horizonte**  
**2016**

**CLAUDIA TEIXEIRA DA COSTA LODI**

**PERFIL DE METILAÇÃO  
DAS ILHAS CpG DOS GENES  
*CDH1, TIMP3 E MGMT*  
COMO FATORES PREDITORES  
PARA RECIDIVA DE  
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL  
EM MULHERES INFECTADAS E  
NÃO INFECTADAS PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Programa : Saúde da Mulher

Área de Concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica e Mamária

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo

Coorientadora: Prof. Dra. Marcia Antoniazzi Michelin

Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina – UFMG  
2016

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Profa. Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitor de Pós-Graduação: **Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitora de Pesquisa: **Profa. Adelina Martha dos Reis**

## **Faculdade de Medicina**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Luiz Armando Cunha De Marco**

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: **Profa. Ana Cristina Côrtes Gama**

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia: **Profª. Márcia Mendonça Carneiro**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: **Prof. Selmo Geber**

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: **Prof. Fernando Marcos dos Reis**

## **Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:**

**Prof. Selmo Geber**

**Prof. Agnaldo Lopes da Silva Filho**

**Prof. Rubens Lene Carvalho Tavares**

**Profª. Zilma Nogueira Reis**

**Profª. Alamanda Kfoury Pereira**

## **Dedico esta tese**

Ao meu pai, Luiz Alberto, meu maior amigo,  
por sempre acreditar em minha capacidade,  
seu amor e exemplo de vida.

Obrigada por estar ao meu lado sempre.

A minha mãe, Angela Maria, minha maior amiga,  
por seus ensinamentos, por seu amor,  
seu exemplo e sua total dedicação.

“Falar de minha mãe é falar de saudade”

Ao meu marido, Oswaldo,  
por sua compreensão, incentivo, por caminhar ao meu lado,  
por ser tão importante na minha vida.

Meu companheiro, meu amor.

## AGRADECIMENTOS

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

De maneira especial ao meu orientador, Professor Dr Victor Hugo de Melo, pelos ensinamentos, seu exemplo de ética, dedicação, por confiar na minha capacidade, por seu carinho e principalmente seu apoio e amizade.

À Professora Dra Marcia Antoniazi Michelin, coorientadora, pelo apoio e execução da técnica de biologia molecular desta pesquisa.

Ao Professor Dr Eddie Fernando Cândido Murta, pela atenção, disponibilidade e correções deste estudo.

À Dra Maria Inês de Miranda Lima, que disponibilizou material de sua tese de doutorado.

À Leticia Montes, por sua dedicação e por estar na bancada comigo compartilhando minhas angústias e conquistas.

A todos do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), pelo carinho durante o meu período de trabalho no laboratório.

À Sra Sônia Maria Penido de Freitas, bibliotecária, pelo auxílio em toda a revisão bibliográfica deste estudo.

Ao Dr Carlos Alberto Ribeiro, quem realizou todas as revisões histológicas deste estudo.

A todas as pacientes, razão deste estudo, pela colaboração na realização deste projeto.

**“Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas.”**

**Luis Fernando Veríssimo**

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *MGMT*, *TIMP3* e *CDH1* em mulheres infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), com recidiva ou não de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). **Método:** estudo caso-controle, aninhado a uma coorte, com 33 mulheres que apresentaram recidiva de NIC (casos) e 114 sem recidiva (controles), infectadas pelo HIV (n=74) e não infectadas (n=73), tratadas por cirurgia de alta frequência (CAF), no período de janeiro de 1999 a maio de 2004. O diagnóstico de recidiva foi estabelecido após biópsia. O perfil de metilação dos genes foi avaliado por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase metilação específica quantitativa (MSQP), em peças de cone cervical, fixados em formol e parafinados. Análise estatística foi realizada para comparação das variáveis categóricas usando-se teste  $X^2$  com correção de Yates e teste exato de Fisher. Análise multivariada foi feita por regressão logística. **Resultados:** a recidiva de NIC foi mais frequente em mulheres infectadas pelo HIV (OR 2,47; IC 95%: 0,87-7,05), com margens comprometidas (OR 2,5; IC 95%: 0,87-7,27) e com ocupação glandular (OR 11,6; IC 95%: 2,93-45,89). Não houve diferença significativa quando foram comparados os perfis de metilação dos genes *CDH1*, *MGMT*, *TIMP3* em relação à infecção pelo HIV, ao grau de lesão da CAF e à recidiva de NIC. Pelo menos um dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* esteve presente metilado em 85,1% das mulheres infectadas pelo HIV, em 91,6% das mulheres com NIC II/III e em 87,9% das mulheres com recidiva de NIC. **Conclusão:** Os fatores associados à recidiva foram a ocupação glandular e margens comprometidas no cone e a infecção pelo HIV. O perfil de metilação das ilhas CpG dos genes estudados não foram significantes.

**Palavras-chave:** Metilação de DNA. Vírus da imunodeficiência humana. Neoplasia intraepitelial cervical. Recidiva. Cirurgia de alta frequência. Papilomavírus humano.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the profile of methylation in CpG islands of *MGMT*, *TIMP3*, *CDH1* genes in human immunodeficiency virus (HIV) infected and noninfected women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) recurrence or no recurrence. **Method:** Nested case-control study involving 33 women with CIN recurrence (cases) and 114 without recurrence (controls), HIV infected (n=74) and noninfected (n=73), treated with loop electrosurgical excision procedure (LEEP), between January 1999 and May 2004. Recurrence diagnosis was established after biopsy. The methylation profile of the genes was assessed by methylation-specific quantitative PCR (MSQP) technique in formalin-fixed, paraffin-embedded cone specimens. Statistical analysis were performed to compare categorical variables, using  $\chi^2$  test with Yates correction and Fisher's exact test. Multivariate analysis was carried out using a logistic regression. **Results:** CIN Recurrence was more frequent in HIV-infected women (OR 2,47; CI 95%: 0,87-7,05), and in those with compromised margins (OR 2,5; CI 95%: 0,87-7,27) and glandular involvement (OR 11,6; CI 95%: 2,93-45,89). There was no significant difference when compared methylation profiles of *CDH1*, *TIMP3* and *MGMT* genes in relation to HIV infection, CIN grade and recurrence. At least one methylated gene, *CDH1*, *TIMP3* and *MGMT*, was present in 85.1% HIV-infected women, in 91.6% women with CIN II/III and 87.9% women with CIN recurrence. **Conclusions:** Factors associated with recurrence were glandular involvement and compromised margins in cone biopsy and HIV infection. The profile of methylation in CpG islands of genes studied were not significant.

**Keywords:** DNA methylation. Human immunodeficiency virus. Cervical intraepithelial neoplasia. Recurrence. Loop electrosurgical excision procedure. Human papillomavirus.

## ILUSTRAÇÕES

### Figuras

Figura 1- Representação esquemática do genoma do HPV 16. ....	22
Figura 2- Representação esquemática das alterações epigenéticas .....	26
Figura 3- Vias bioquímicas para a metilação e desmetilação da citosina.....	27
Figura 4- Estrutura da cromatina de promotores ativos e inativos. ....	29
Figura 5- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene <i>TIMP3</i> metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene <i>TIMP3</i> não metilado. ....	52
Figura 6- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene <i>MGMT</i> metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene <i>MGMT</i> não metilado.....	53
Figura 7- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene <i>CDH1</i> metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene <i>CDH1</i> não metilado. ....	54
Figura 8- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP da $\beta$ actina.....	55

### Quadros

Quadro 1- Biomarcadores incluídos no estudo .....	34
Quadro 2- Sequência de <i>primers</i> para detecção DNA-HPV .....	41
Quadro 3- Sequência dos <i>primers</i> dos genes em estudo.....	45
Quadro 4- Estudos metilação de DNA em NIC, HIV e câncer cervical.....	97

## TABELAS

Tabela 1- Reação <i>Kit QIAGEN</i> .....	44
Tabela 2- Volume de amostra e <i>primers</i> , concentração do estoque e da reação e condições de temperatura de anelamento em cada reação.....	45
Tabela 3- Quantificação do DNA das amostras .....	51
Tabela 4- Comparação da mediana entre as variáveis sociodemográficas, segundo a infecção pelo HIV .....	56
Tabela 5- Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a infecção pelo HIV.....	57
Tabela 6- Comparação entre os exames propedêuticos, segundo a infecção pelo HIV. ....	59
Tabela 7- Perfil de metilação dos genes, segundo a infecção pelo HIV.....	61
Tabela 8- Número de genes metilados, segundo a infecção pelo HIV.....	62
Tabela 9- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, independente da infecção pelo HIV. ....	63
Tabela 10- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV. ....	65
Tabela 11- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV. ....	66
Tabela 12- Número de genes metilados, segundo o grau de NIC.....	68
Tabela 13- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, independente da infecção pelo HIV.....	69
Tabela 14- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV.....	71
Tabela 15- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV.....	72
Tabela 16- Número de genes metilados, segundo os graus de NIC. ....	73
Tabela 17- Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a recidiva ou não de NIC. ....	75
Tabela 18- Comparação entre os exames propedêuticos, segundo a recidiva ou não de NIC. ....	77

Tabela 19- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, independente da infecção pelo HIV.....	79
Tabela 20- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV.....	81
Tabela 21- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV.....	82
Tabela 22- Número de genes metilados, segundo a recidiva de NIC. ....	83
Tabela 23- Modelo inicial da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC. ....	84
Tabela 24- Modelo final da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC. ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
A	Amplitude
<i>APC</i>	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>
ASC-US	Atipias de células escamosas de significado indeterminado
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básicos
<i>BRCA1</i>	<i>Breast cancer 1</i>
C	Citosina
°C	Grau Celsius
<i>CADM1</i>	<i>Cell adhesion molecule 1</i>
CAF	Cirurgia de alta frequência
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1</i>
<i>CDH13</i>	<i>Cadherin 13</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CH <sub>3</sub>	Grupo metil
COEP - CEP	Comitê de ética em pesquisa
CpG	Dinucleotídeo Citosina-Guanina
Ct	<i>CycleThreshold</i>
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias
<i>DAPK1</i>	<i>Death-associated protein kinase 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Acido desoxirribonucleico Metiltransferase
DNMT1	Acido desoxirribonucleico Metiltransferase 1
DNMT2	Acido desoxirribonucleico Metiltransferase 2
DNMT3A	Acido desoxirribonucleico Metiltransferase 3A
DNMT3B	Acido desoxirribonucleico Metiltransferase 3B

dp	Desvio padrão
<i>ECAD</i>	E- caderina
<i>FHIT</i>	<i>Fragile histidine triad gene</i>
G	Guanina
g	Força gravitacional
<i>GSTP1</i>	<i>Glutathione S-transferase pi</i>
HAART	Terapia antirretroviral potente
HDAC	Histona deacetilase
<i>HIC1</i>	<i>Hypermethylated in cancer 1</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
<i>hMLH1</i>	<i>Human mutL Homologue 1</i>
HPV	Papilomavírus humano
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
JEC	Junção escamo -colunar
<i>MAL</i>	<i>T lymphocyte maturation-associated protein</i>
MBP	<i>Methyl Binding Proteins</i>
<i>MGMT</i>	<i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>MIR124-2</i>	<i>MicroRNA hsa-miR-124-2</i>
mL	mililitro
<i>MLH1</i>	<i>Mutl homologue 1</i>
MMP	Proteína metaloproteinase de matriz
ng	nanograma
MSQP	<i>Methylation-Specific quantitative PCR</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grau I

NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grau II
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grau III
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>TP14</i>	<i>Tumor protein 14</i>
<i>TP15</i>	<i>Tumor protein 15</i>
<i>TP16</i>	<i>Tumor protein 16</i>
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein 53</i>
<i>TP73</i>	<i>Tumor protein 73</i>
PAM	Posto de atendimento médico
PBH	Prefeitura de Belo Horizonte
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>pRb</i>	Proteína do retinoblastoma
<i>RAR<math>\beta</math></i>	<i>Retinoic acid receptor beta</i>
<i>RASSF1</i>	<i>RAS association domain family 1A</i>
RNAase	Enzima acido ribonucleico
SAM	S-adenosilmetionina
SMSA	Secretaria Municipal de Saúde
<i>SPSS</i>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
T	Timina
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
<i>TIMP1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinases1
<i>TIMP2</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinases2
<i>TIMP3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinases3
<i>TWIST1</i>	<i>Twist-related protein 1</i>
U	Uracila

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFTM	Universidade Federal do Triangulo Mineiro
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO	<i>World Health Organization</i>
μl	Microlitro
μM	Micromolar
5-MeC	Carbono 5 de Citosina

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2-1 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC) .....	21
2-1-1 Papilomavírus humano (HPV) .....	21
2-1-2 Vírus da imunodeficiência humana (HIV) .....	23
2-1-3 Recidiva da neoplasia intraepitelial cervical (NIC).....	24
2-1-4 Rastreamento do câncer cervical .....	25
2-2 Epigenética .....	26
2-2-1 Metilação de DNA e câncer .....	30
2-2-2 Metilação de DNA e HPV .....	32
2-2-3 Metilação de DNA e câncer cervical.....	33
2-3 Biomarcadores.....	34
2-3-1 <i>MGMT</i> (Metiltransferase de DNA-O-6-metilguanina).....	35
2-3-2 <i>CDH1</i> (E- caderina).....	35
2-3-3 <i>TIMP3</i> (Inibidor de metaloproteinase 3) .....	35
3 OBJETIVOS .....	37
3-1 Geral .....	37
3-2 Específicos.....	37
4 PACIENTES E MÉTODO .....	38
4-1 Desenho do estudo.....	38
4-2 Pacientes .....	38
4-3 Critérios de inclusão .....	39
4-4 Critérios de exclusão .....	39
4-5 Método.....	40
4-5-1 Teste de triagem sorológica para o HIV .....	40
4-5-2 Conização por CAF .....	40

4-5-3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do HPV .....	41
4-5-4 Análise microscópica.....	41
4-5-5 Extração de DNA das amostras parafinadas.....	41
4-5-6 Quantificação do DNA na amostra .....	42
4-5-7 Ensaio de conversão do DNA com bissulfito de sódio .....	43
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
5.1 Cálculo amostral .....	46
5.2 Análise univariada.....	48
5-2-1 Análise univariada descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV .....	48
5-2-2 Análise do perfil de metilação, das ilhas CpG, dos genes em relação ao grau de NIC .....	48
5-2-3 Análise univariada dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de NIC .....	48
5.3 Análise multivariada.....	49
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	50
7 RESULTADOS .....	51
7-1 Resultados laboratoriais.....	51
7-2 Resultados das análises estatísticas .....	55
7-2-1 Resultados da análise univariada descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não Infectadas pelo HIV. ....	56
7-2-2 Resultados da análise do perfil de metilação dos genes, em relação ao grau de NIC .....	62
7-2-3 Resultados da análise univariada, dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, em relação à recidiva ou não da NIC.....	74
7-3-4 Análise multivariada .....	84
8 DISCUSSÃO .....	86
8-1 Discussão dos resultados das análises dos grupos de mulheres infectadas ou não pelo HIV .....	86

8-2 Discussão dos resultados das análises dos genes segundo o grau de NIC ....	89
8-3 Discussão dos resultados das análises dos grupos em relação à ocorrência ou não de recidiva de NIC.....	91
8-4 Comentários finais .....	96
9 CONCLUSÕES .....	99
REFERÊNCIAS .....	100
ANEXOS E APÊNDICES .....	125

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é a segunda causa de morte por câncer em mulheres nos países em desenvolvimento, (Parkin *et al.*, 2001; Schiffman *et al.*, 2007; Zur Hausen, 2009; Singh *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Ferlay *et al.*, 2015), sendo o carcinoma de células escamosas o mais frequente (Moore, 2006; Wilting *et al.*, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que o número estimado de novos casos de câncer em todo o mundo chegará a 20 milhões em 2025 (INCA,2016). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016/2017 é de 16.340 novos casos de câncer, risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres, sendo hoje considerado um problema de saúde pública, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões (INCA,2016). Sua incidência é maior em países menos desenvolvidos, inicia a partir de 30 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos.

Desenvolve-se a partir de lesões precursoras, as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e tem como fatores de risco, a infecção persistente pelo papilomavírus humano oncogênico (HPV), fatores ligados à imunidade, à genética, às alterações epigenéticas e ao comportamento sexual. Possui um grande potencial de prevenção e cura, quando diagnosticado em suas fases iniciais (Jones e Baylin, 2002). Apesar de ter uma longa fase pré invasiva e sua história natural ser bem conhecida (Richart e Barron, 1969) sua incidência ainda é bastante elevada (Schiffman *et al.*, 2007).

Mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam significativo aumento do risco de desenvolver NIC, assim como as taxas de recidiva de lesão, após tratamento, nessas mulheres são elevadas quando comparadas com as de não infectadas (Davis *et al.*, 2001; Heard *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Russomano *et al.*, 2013; Huchko *et al.*, 2014; Huchko *et al.*, 2015).

Desde a introdução da citologia oncótica, a mortalidade por câncer cervical diminuiu em todo o mundo. No entanto a sensibilidade da citologia para identificar lesão de alto grau é baixa. Testes de DNA HPV têm sido aceitos na tentativa de melhorar a triagem de mulheres com lesões. No entanto 40-60% de mulheres com atipias de

células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) são HPV positivas e menos de 1% desenvolvem câncer. Desta forma, novos testes são necessários para melhorar a acurácia (Arbyn *et al.*, 2008).

O perfil epigenético pode ser utilizado no diagnóstico e prognóstico de diversos tipos de câncer (Figuroa *et al.*, 2010). Denomina-se epigenética qualquer mudança da expressão de um gene sem que ocorra alteração na sequência de seu DNA. A metilação é um dos principais fenômenos epigenéticos pelo qual um gene é silenciado (Schiffman *et al.*, 2007; Szyf, 2007).

Estudos de metilação de DNA têm surgido como importante campo de pesquisa em muitas doenças, como o câncer, melhorando a acurácia no seu diagnóstico, prognóstico e tratamento (Wajed *et al.*, 2001; Dueñas-González *et al.*, 2005; Szalmás e Kónya, 2009; Baylin e Jones, 2011; Heyn e Esteller, 2012; Banzai *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Baseado nessas observações, este trabalho avalia o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* e sua correlação com dados clínicos, das mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, a fim de determinar sua utilidade como marcadores tumorais, para diagnóstico precoce de NIC e risco de recidiva de lesão.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2-1 Neoplasia intraepitelial cervical (NIC)**

NIC é a lesão precursora do câncer cervical, não tendo ultrapassado a membrana basal do epitélio, podendo regredir, persistir ou progredir para o câncer invasivo, o que acontece em aproximadamente 1 a 3% dos casos (Michelin *et al.*, 2008).

NIC I indica lesão de baixo grau e representa infecção ativa pelo vírus HPV. NIC II e III são consideradas lesões de alto grau, precursoras do câncer cervical, de maior risco de evolução para lesão invasora se não tratadas, embora NIC II possa regredir espontaneamente em 40% dos casos (Castle *et al.*, 2009) e NIC III ter menor chance de regressão (Zur Hausen, 2000; Naucler *et al.*, 2007; Elit *et al.*, 2011; Doorbar *et al.*, 2012).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da NIC e do câncer cervical são a infecção persistente pelo vírus HPV oncogênico, principalmente HPV 16 e 18 presentes em 70% dos casos, seguidos pelos HPV 31 e 33 (Bosch *et al.*, 2002; Wentzensen *et al.*, 2012; Vasiljević *et al.*, 2014), idade precoce do início de atividade sexual, maior número de parceiros sexuais, uso de contraceptivos hormonais, elevada paridade, tabagismo, co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou outras doenças sexualmente transmissíveis e imunossupressão (Bosch e De Sanjosé, 2007; Bosch *et al.*, 2008; Stanley, 2010; Brown e Trimble, 2012; Luhn *et al.*, 2013).

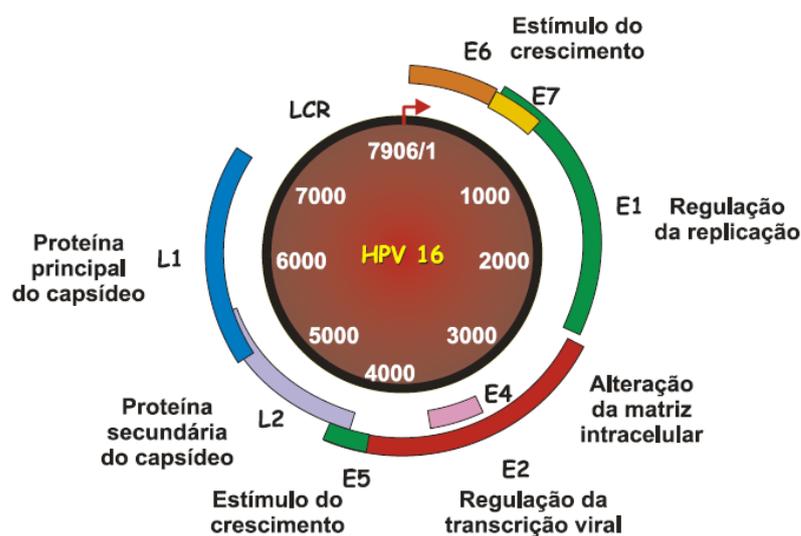
O desafio é identificar quais mulheres são de risco para doença progressiva, o câncer cervical invasor (Monsonogo *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2007; Castle *et al.*, 2009).

#### **2-1-1 Papilomavírus humano (HPV)**

O genoma do HPV é composto de uma dupla fita de DNA que pode ser dividida em três regiões distintas: LCR (*Long Control Region*), L (*late*: região tardia), com duas estruturas: L1, utilizada para a tipagem do HPV, e L2; E (*early*: região precoce), com

seis estruturas - E1, E2, E4, E5, E6 e E7; e R (região regulatória) (Zur Hausen, 2000; Fausch *et al.*, 2002) (FIG. 1).

**Figura 1- Representação esquemática do genoma do HPV 16.**



**Fonte:** Revisado por (Villa, 1997)

A região LCR regula a replicação do DNA e a região E está envolvida na replicação viral e na oncogênese (Burd, 2003) sendo que E6 e E7 interagem com as proteínas supressoras de tumor - proteína 53 (*TP53*) e proteína do retinoblastoma (*TPRb*), respectivamente, resultando em atividade transcricional descontrolada e replicação alterada de DNA e divisão celular. E2 produz uma proteína ligante ao DNA que bloqueia a transcrição dos genes E6 e E7. Durante a carcinogênese, existem duas formas de DNA HPV no núcleo da célula do epitélio cervical, uma epissomal e uma integrada. Integração do DNA HPV ao genoma da célula leva a perda de expressão de E2, e conseqüentemente ao aumento da expressão de E6 e E7 (Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Schiffman *et al.*, 2007; Steben e Duarte-Franco, 2007; Fernandez e Esteller, 2010; Moody e Laimins, 2010).

São conhecidos mais de 230 tipos de HPV, com base na sequência do DNA viral (Fuessel Haws *et al.*, 2004). Aproximadamente 40 tipos são comumente encontrados no trato genital (Lorincz *et al.*, 1992; Levi *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). Os tipos 16, 18, 31, 33,35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 são considerados oncogênicos ou de alto risco, por estarem associados às neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC II e III) ou câncer, sendo o 16 e 18 os mais

prevalentes e relacionados à persistência e progressão da NIC (Bosch *et al.*, 1995; Schiffman *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008; Thomison *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Luhn *et al.*, 2013). Os tipos 26, 53 e 66 são provavelmente carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *condHPV89/Cp6108* são tidos como de baixo risco, presentes nas verrugas genitais e na neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) (Mcmurray *et al.*, 2001; Bosch *et al.*, 2002; Levi *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2005; Clifford, G. *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2007).

Está bem estabelecido, biológica e epidemiologicamente, que a infecção persistente pelo HPV de alto risco é a principal causa do câncer cervical, se não tratada (Muñoz *et al.*, 2006; Schiffman *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008; Cox *et al.*, 2009), embora a maioria das mulheres infectadas com HPV de alto risco evolui com clareamento da infecção dentro de aproximadamente dois anos (Koshiol *et al.*, 2008; Stanley, 2010). A integração do DNA HPV ao genoma da célula hospedeira é necessária para o desenvolvimento de NIC e câncer invasor (Walboomers *et al.*, 1999; Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Schiffman *et al.*, 2007). Sabe-se que o HPV isoladamente não é capaz de induzir a progressão da lesão, sendo também necessárias outras alterações, como as genéticas e epigenéticas para o desenvolvimento da carcinogênese (Szalmás e Kónya, 2009; Saavedra *et al.*, 2012; Cheung *et al.*, 2013; Mirabello *et al.*, 2013; Bryant *et al.*, 2014).

### **2-1-2 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)**

O HIV é um retrovírus com genoma ácido ribonucléico (RNA). Infecta e induz à morte celular, principalmente em uma variedade de linhagem celular humana. O linfócito T CD4+ é o maior alvo da infecção viral e as células CD4+ circulantes tornam-se constantemente diminuídas no sangue periférico, na maioria das pessoas infectadas e não tratadas (Greenblatt e Hessel, 2001).

Estudos mostram um aumento na incidência, que varia de 2 a 22 vezes, a chance de câncer cervical invasivo em mulheres infectadas pelo HIV, quando comparadas as mulheres não infectadas (Chaturvedi *et al.*, 2009; Denny *et al.*, 2012).

Mulheres infectadas pelo HIV têm alta prevalência da infecção pelo HPV, assim como infecção por múltiplos tipos do vírus e maior persistência da infecção, o que conseqüentemente leva a maior incidência, progressão e recidiva de NIC nestas mulheres (Frisch *et al.*, 2000; Pantanowitz, 2010; Corrêa *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2012; De Vuyst *et al.*, 2012; Russomano *et al.*, 2013; Ezechi *et al.*, 2014).

É também fato bem documentado que as lesões tendem a ser mais agressivas e sua progressão mais rápida; além disso, as lesões são de difícil tratamento e apresentam alta taxa de recorrência (Levi *et al.*, 2004; Clifford, G. M. *et al.*, 2006; Berrébi *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Malapati *et al.*, 2011; Denslow *et al.*, 2014). Por causa desse elevado percentual de recidiva, alguns autores preconizam o uso de técnicas excisionais em mulheres infectadas pelo HIV com NIC I (Fruchter *et al.*, 1996; Nappi *et al.*, 2005).

### **2-1-3 Recidiva da neoplasia intraepitelial cervical (NIC)**

Estudos consideram doença residual aquela identificada durante o primeiro ano após a conização e recidiva quando acontece após esse período (Gonzalez *et al.*, 2001; Milojkovic, 2002; Paraskevaidis *et al.*, 2003; Van Hamont *et al.*, 2006; Kitchener *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2012).

Taxas de recidiva de NIC após conização por cirurgia de alta frequência (CAF) variam de 5 a 30%, necessitando as pacientes de seguimento e novo tratamento quando se identificam lesões (Alonso *et al.*, 2006; Bae *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009; Nam *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Serati *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2013; Katki *et al.*, 2013; Russomano *et al.*, 2013; Del Mistro *et al.*, 2015; Herfs *et al.*, 2015).

Vários fatores têm sido associados ao risco de recidiva de NIC, como margens cirúrgicas comprometidas (Maluf *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2006; Ghaem-Maghami *et al.*, 2007; Prato *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009; Baloglu *et al.*, 2010; Cejtin *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2011; Serati *et al.*, 2012), ocupação glandular (Fogle *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009; Pantanowitz, 2010; Lodi *et al.*, 2011; Lubrano *et al.*, 2012; Kodampur *et al.*, 2013), imunossupressão (Skinner *et al.*, 2004; Maluf *et al.*, 2008;

Lima *et al.*, 2009; Cejtin *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2011; Russomano *et al.*, 2013; Huchko *et al.*, 2014; Huchko *et al.*, 2015); infecção persistente pelo HPV (Verguts *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2013; Herfs *et al.*, 2015) e doença multifocal (Gardeil *et al.*, 1997; Baloglu *et al.*, 2010). A idade da paciente e o grau de lesão de NIC foram relatados em alguns estudos como fatores de risco (Zaitoun *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2006; Verguts *et al.*, 2006; Ghaem-Maghami *et al.*, 2007; Serati *et al.*, 2012), não sendo mencionados em outros (Dietrich *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Kodampur *et al.*, 2013; Russomano *et al.*, 2013; Herfs *et al.*, 2015).

#### **2-1-4 Rastreamento do câncer cervical**

O objetivo do rastreamento é identificar pacientes de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. A realização periódica do exame citopatológico continua sendo a estratégia mais adotada para o rastreamento (INCA,2016).

Embora o rastreamento citológico tenha reduzido substancialmente a incidência e a mortalidade pelo câncer cervical, é um exame que apresenta baixa sensibilidade (Schiffman *et al.*, 2007; Arbyn *et al.*, 2010). O máximo de sensibilidade encontrada para diagnóstico de NIC II e III foi 55,2 % e 57,1% respectivamente (Arbyn *et al.*, 2008; Arbyn *et al.*, 2010). Estratégias de triagem, como co-teste para HPV apresentam bons valores preditivos negativos (VPN), ou seja, um processo oncogênico pode ser excluído com grande certeza (Kitchener *et al.*, 2008; Szalmás e Kónya, 2009; Arbyn *et al.*, 2012), mas seu valor preditivo positivo (VPP) é baixo (Bulkmans *et al.*, 2007; Naucler *et al.*, 2007; Cuzick *et al.*, 2008; Kinney *et al.*, 2010; Cuzick *et al.*, 2012).

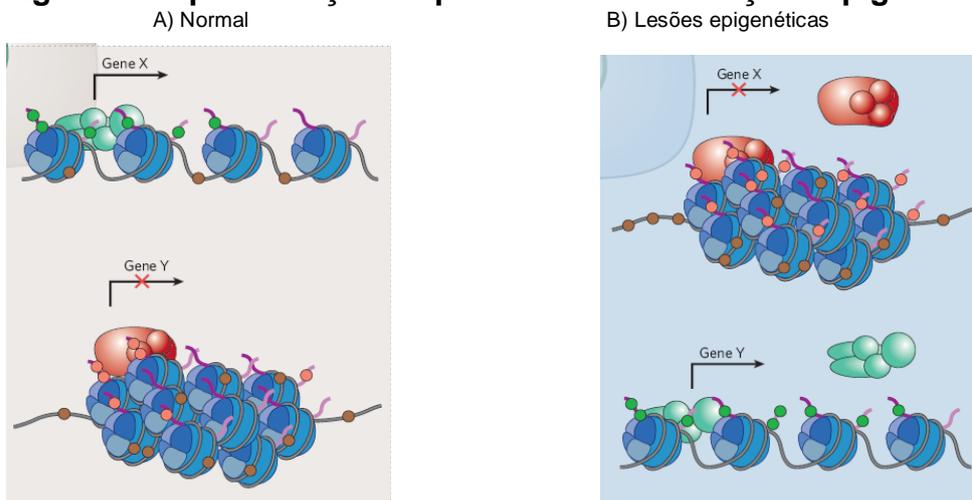
Estudos demonstram que alterações epigenéticas desempenham um papel importante durante a carcinogênese, estando presentes em lesões pré invasivas e invasivas e que a metilação de DNA pode ser útil como marcador para detecção precoce de lesões precursoras do câncer (Kanai *et al.*, 1998; Momparler, 2003; Narayan *et al.*, 2003; Egger *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2005; Baylin e Ohm, 2006; Wentzensen e Von Knebel Doeberitz, 2007; Fernandez e Esteller, 2010).

## 2-2 Epigenética

É definida como o estudo das modificações do DNA e das histonas que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA (Schiffman *et al.*, 2007; Szyf, 2007). Nos processos de oncogênese existe grande influência dos mecanismos epigenéticos, por alterarem a expressão de genes envolvidos (Ting *et al.*, 2006; Houshdaran *et al.*, 2010).

As duas mudanças epigenéticas mais amplamente estudadas são a metilação de DNA e a acetilação das histonas (Egger *et al.*, 2004; Feinberg, 2007). Histonas são proteínas associadas às moléculas de DNA que determinam o grau de compactação da cromatina, podendo sofrer metilação, fosforilação e acetilação. Na molécula de DNA ocorre apenas a metilação (Szyf, 2007) e diferente das mutações genéticas, são alterações potencialmente reversíveis (Myöhänen *et al.*, 1998; Baylin, 2002; Jones e Baylin, 2002) (FIG. 2).

**Figura 2- Representação esquemática das alterações epigenéticas**

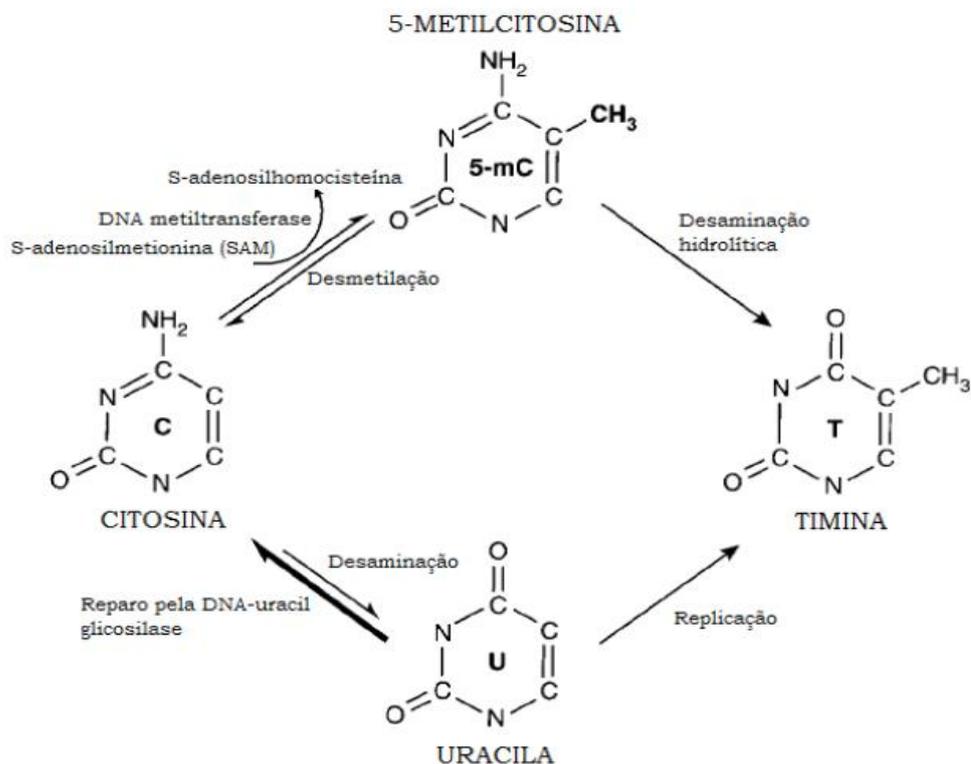


A) X é um gene ativo para transcrição com metilação esparsa no DNA (círculos marrons), estrutura da cromatina aberta, interação com proteínas e modificações das histonas (círculos verdes). Y é um gene silenciado com densa metilação do DNA, estrutura da cromatina fechada, interação com proteínas (círculos vermelhos) e modificações das histonas (círculos rosas). B) A célula normal pode alterar seu epigenótipo através do silenciamento de genes, normalmente ativos (gene X) ou através da ativação de genes normalmente silenciados (gene Y), com as alterações na metilação do DNA e modificação das histonas.

Fonte: (Feinberg, 2007)

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC) que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT) (Singal e Ginder, 1999) (FIG.3).

**Figura 3- Vias bioquímicas para a metilação e desmetilação da citosina.**



A citosina é metilada pela DNA metiltransferase (DNMT) a partir da remoção do grupo metil do substrato SAM. A desaminação hidrolítica espontânea sob os resíduos de citosina metilada promove a transição para timina que não é revertida enquanto que a desaminação sob a citosina normal converte em uracila que é reconhecida pela enzima DNA uracil glicosilase e é reparada.

**Fonte:** (Singal e Ginder, 1999)

As DNA metiltransferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação), conhecidas como metilases de manutenção, como a DNMT1; e outro grupo, responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B. Entretanto, os processos que iniciam a metilação *de novo* ainda são desconhecidos (Singal e Ginder, 1999; Szyf, 2007; Yang *et al.*, 2008; Valeri *et al.*, 2009).

Citosina metilada (*5-metilcitosina*) também apresenta uma grande propensão a desaminação espontânea, levando a formação de timina. Sendo timina um componente do DNA humano, esta mutação não é reconhecida corretamente pelos mecanismos de reparação do DNA (Wajed *et al.*, 2001). Se isso ocorre em um gene supressor de tumor há o desenvolvimento de um ponto de mutação (mutação pontual onde havia o par de bases C-G haverá o par T-A) e com isso a perda do controle celular com subsequente proliferação da célula (Laird, 1997; Wajed *et al.*, 2001; Grønbaek *et al.*, 2007).

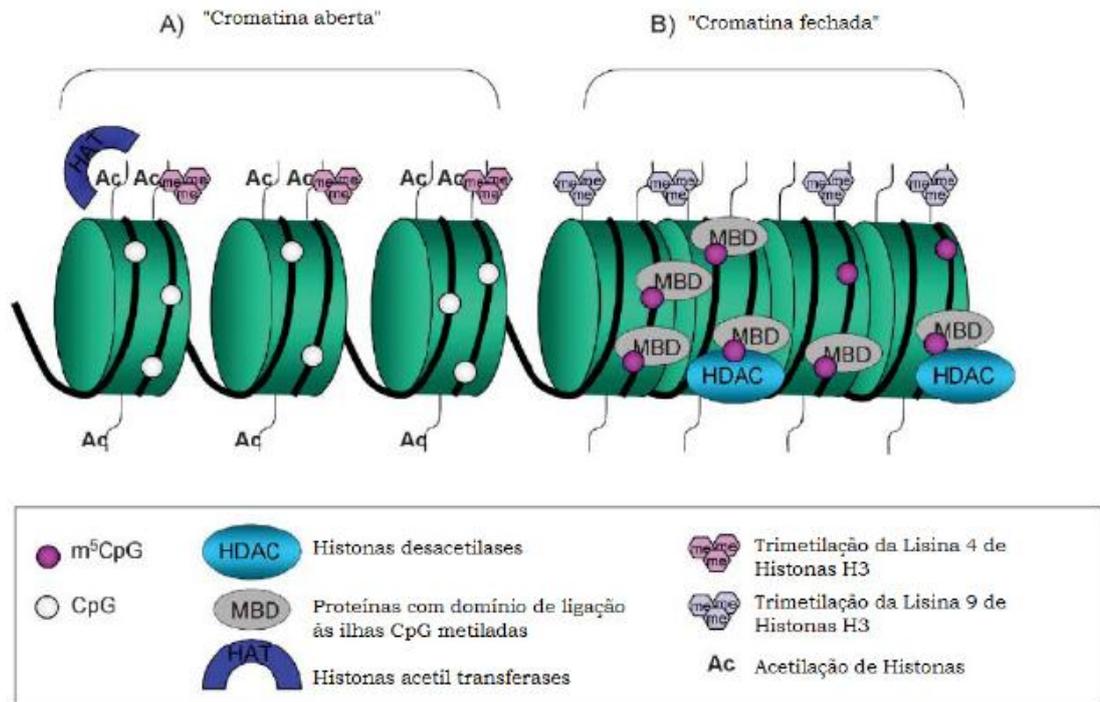
Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG (regiões do DNA maiores do que 200 pares de bases, contendo 50% de bases citosina (C) e guanina (G) e aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG), encontradas em todos os genes em regiões ativas, os promotores, que são sequências regulatórias presentes na extremidade 5' do DNA, logo antes do início do gene que será transcrito. Nas células normais, a maioria dos dinucleotídeos CpG esparsos está metilada, enquanto das ilhas CpG estão desmetiladas. Se ocorrer a metilação, o promotor é silenciado, interrompendo a transcrição e a expressão gênica (Morgan *et al.*, 2004; Grønbaek *et al.*, 2007; Jones e Baylin, 2007).

Proteínas *Methyl Binding Proteins* (MBP) apresentam afinidade pelo grupo metil e se ligam aos dinucleotídeos CpG metilados, nas regiões promotoras impedindo o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios, levando à condensação da cromatina (Attwood *et al.*, 2002; Grønbaek *et al.*, 2007).

Alteração na estrutura da cromatina também exerce importante papel na regulação da expressão gênica. A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, que consiste em 146 pares de bases DNA envolvendo histonas. Acetilação ou deacetilação das histonas alteram os nucleossomos. A deacetilação leva a uma cromatina compacta que não permite a transcrição e a acetilação por sua vez abre a estrutura da cromatina o que permite a transcrição dos genes. Histona deacetilase (HDAC) remove o grupo acetil revertendo o processo e silenciando a expressão de genes. Alteração de HDAC leva provavelmente à deacetilação aberrante de histonas e pode estar também associado com transformação neoplásica da célula (Johnstone, 2002;

Grønbaek *et al.*, 2007) (FIG. 4). Uma importante interação entre aberrante metilação DNA e deacetilação de histonas está relacionada à tumorigênese (Cameron *et al.*, 1999; Grønbaek *et al.*, 2007).

**Figura 4- Estrutura da cromatina de promotores ativos e inativos.**



A cromatina transcricionalmente ativa caracterizada por citosinas não metiladas, caudas das histonas acetiladas e trimetilação da lisina 4 de histonas H3 (A) enquanto que, quando as citosinas são metiladas ocorre a ligação com as proteínas BMDs que atraem HDACs que removem grupos acetil da cauda das histonas. O DNA torna-se altamente condensado em uma estrutura “fechada” da cromatina que carrega a marca do silenciamento gênico com a trimetilação da lisina 9 de histona H3 (B).

Fonte:(Grønbaek *et al.*, 2007)

Alterações epigenéticas são altamente influenciadas pelo ambiente, uma vez que os doadores de radical metil são obtidos pela dieta e são principalmente a metionina, folato, colina e vitamina B12. Outros fatores também estão envolvidos na modulação da metilação incluindo poluentes como íons metálicos, medicamentos, fungicidas, exposição a determinados vírus e fumo podendo causar metilação ou desmetilação no genoma alterando assim sua expressão (Lichtenstein *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2007; Szyf, 2007).

## 2-2-1 Metilação de DNA e câncer

Metilação aberrante do DNA tem sido demonstrada, desempenhando papel importante, nos vários estágios do câncer em humanos. De maneira geral, tanto a hiper como a hipometilação do DNA são observadas nos vários tipos de cânceres (Jones e Baylin, 2002; Baylin e Ohm, 2006; Baylin e Jones, 2011; Heyn e Esteller, 2012).

A desmetilação do DNA ocorre com a ação das enzimas desmetilases necessária para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em resposta às perturbações ambientais. A desmetilação também ocorre de forma passiva, com a inativação das metiltransferases durante o ciclo celular, levando ao aumento da transcrição gênica, tornando o DNA hipometilado (Attwood *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2004).

Hipometilação do DNA é uma importante alteração no padrão de metilação encontrada no câncer (Herman e Baylin, 2003; Esteller, 2008). Está relacionada a diferentes estágios de progressão de vários tipos de tumores e metástases causando instabilidade cromossômica, mutação genética e reativação de vários genes relacionados ao câncer, assim como ativação do HPV 16 no câncer cervical (Cui *et al.*, 2002; Feinberg e Tycko, 2004; Wilson *et al.*, 2007).

A hipermetilação de DNA é outra alteração frequentemente encontrada nas fases iniciais de progressão tumoral (Issa *et al.*, 1994; Ahuja *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Wentzensen *et al.*, 2009). Essa alteração epigenética precoce pode realmente levar a perda do controle do ciclo celular, regulação alterada de fatores de transcrição genética, desarranjo celular, interação célula-substrato com consequente instabilidade genética, característica do câncer humano (Baylin *et al.*, 2001; Henken *et al.*, 2007; Wilting *et al.*, 2010; Yang, 2013).

A metilação não ocorre aleatoriamente no genoma, algumas ilhas de CpG são predominantemente metiladas em vários tipos de tumores (Teodoridis *et al.*, 2004). Metilação das ilhas CpG confere uma vantagem adaptativa às células tumorais (Esteller e Herman, 2002) e por isso tende a ser um evento precoce e frequente

durante a carcinogênese. No entanto, ilhas CpG hipermetiladas não são aleatoriamente distribuídas na carcinogênese, e sim gene-específico (principalmente genes supressores de tumor) e câncer tipo-específico. Observam-se específicos padrões de metilação dentre os tipos de tumor, possibilitando o seu diagnóstico e prognóstico (Bird, 1986; Jones e Baylin, 2007; Mulero-Navarro e Esteller, 2008; Houshdaran *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

Assim, a metilação do DNA exerce uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, (Morgan *et al.*, 2004; Denis *et al.*, 2011; Lorincz, 2011), como é essencial durante a morfogênese para que ocorra desenvolvimento normal, controlando várias funções do genoma como a recombinação durante a meiose, controle da replicação, controle de DNAs parasitas que se inserem no genoma humano, como o DNA viral, estabilização e manutenção da expressão gênica, regulação da diferenciação celular e inativação do cromossoma X. Conseqüentemente, a aberração no padrão de metilação de um gene pode levar a perda de sua função e predispor ao câncer (Ushijima e Asada, 2010; Denis *et al.*, 2011).

Vários autores enfatizam que as anormalidades epigenéticas apresentam um papel relevante em estágios iniciais do câncer e ainda mostram a identificação de um crescente número de genes relacionados ao câncer carregando densa metilação de citosina em ilhas CpG que normalmente não são metiladas em células normais (Jones e Baylin, 2007; Houshdaran *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

Metilação pode ocorrer em genes que exercem diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, como supressão do tumor (*TP14, TP15, TP16, TP73, BRCA1*), reparo do DNA (*hMLH1, MGMT*), invasão e metástase (*CDH1, ECAD, TIMP1, TIMP2, TIMP3, DAPK*) (Hawes *et al.*, 2010).

A presença de metilação, em genes indutores de tumor ou em genes supressores de tumor, afeta o equilíbrio do ciclo celular iniciando o processo neoplásico. Assim, hipometilação pode permitir a expressão de genes indutores de tumor previamente quiescentes e induzir a proliferação celular. Alternativamente, hipermetilação de genes supressores de tumor pode resultar no seu silenciamento resultando em sua

inabilidade em suprimir a proliferação celular (Wajed *et al.*, 2001; Feinberg e Tycko, 2004).

Diante da importância da metilação no desenvolvimento tumoral, torna-se essencial a sua detecção precoce, assim como a sua mensuração. Genes hipermetilados podem ser utilizados como biomarcadores na detecção precoce de tumores (Qureshi *et al.*, 2010).

### **2-2-2 Metilação de DNA e HPV**

Como a infecção pelo HPV é necessária para o desenvolvimento de NIC e do câncer cervical, é importante também considerar as alterações epigenéticas que ocorrem no genoma viral que podem influenciar o processo de carcinogênese assim como as alterações epigenéticas no genoma da mulher (Verma, 2003; Dueñas-González *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2012).

Está bem estabelecido que alguns vírus adquirem a capacidade de regular a expressão de seus genes através da modulação da metilação do DNA. Assim o vírus pode silenciar a ativação de genes supressores de tumor, favorecendo a persistência da infecção viral e escapando assim do sistema de defesa do hospedeiro. Além disso, oncoproteínas virais podem adquirir a habilidade de direta ou indiretamente modular o processo de metilação em direção a silenciar genes celulares que possam interferir com oncogênese (Tsai *et al.*, 2002; Steben e Duarte-Franco, 2007; Saavedra *et al.*, 2012).

Metilação do DNA na região LCR do HPV 16 é um mecanismo através do qual E6 e E7 são silenciados permitindo a ação do mecanismo de defesa da célula hospedeira. A região LCR é também o sítio de ligação de E2 e contém ilhas CpG com potencial para metilação, resultando na inibição da função de E2. Assim esses autores observaram que a hipermetilação de LCR do HPV 16 está diretamente relacionada ao maior grau de lesão cervical (Hong *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que a região L1 do gene HPV 16 e 18 está hipermetilada no carcinoma cervical invasor e está diretamente relacionada ao grau da lesão, sendo

mais frequente que a hipermetilação de LCR, podendo estar relacionada à integração do genoma do HPV ao DNA celular, e ser utilizado como um marcador clínico da progressão do câncer (Turan *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2007; Kalantari *et al.*, 2010; Lorincz *et al.*, 2013; Mirabello *et al.*, 2013).

Hipermetilação do DNA tem sido relatada nos carcinomas cervicais e ocorre independentemente do *status* da infecção pelo HPV (Szalmás e Kónya, 2009).

### **2-2-3 Metilação de DNA e câncer cervical**

Além da infecção pelo HPV de alto risco ser necessária na carcinogênese cervical, outros fatores como a inativação de genes supressores de tumor estão envolvidos na patogênese, nos vários estágios da doença, visto que a maioria das mulheres com NIC não progridem para o câncer invasivo mas permanecem estáveis ou espontaneamente apresentam regressão de lesão ao longo do tempo. Metilação do DNA tem sido detectada em lesões pré-invasoras, sugerindo que esses biomarcadores possam ter valor para o rastreamento do câncer cervical (Holowaty *et al.*, 1999; Dueñas-González *et al.*, 2005; Jones e Baylin, 2007; Esteller, 2008; Brentnall *et al.*, 2014; Lorincz, 2014; Vidal *et al.*, 2014).

Novos métodos de rastreio do câncer cervical estão sendo pesquisados, visando uma cobertura eficiente de todas as mulheres com menor custo. Estes métodos podem ser considerados em três áreas principais: diagnóstico da infecção pelo HPV, identificação de biomarcadores de proliferação celular e detecção de mudanças epigenéticas no hospedeiro ou no vírus (Brown e Trimble, 2012). O uso de biomarcadores pode melhorar a predição de progressão oncogênica bem como reduzir as intervenções cirúrgicas não comprometendo o futuro destas mulheres (Lin *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2013).

A detecção de genes metilados em amostras cervicais é tecnicamente viável e representa uma fonte importante para a detecção de biomarcadores relevantes na carcinogênese cervical, embora a frequência de metilação para um mesmo gene ainda varie muito entre os estudos (Lorincz, 2014). Os pré-requisitos para um biomarcador são: que haja confiabilidade na sua medição e que ele tenha elevada

sensibilidade e especificidade para detecção de doença, resultando em um bom VPP. Alguns genes promissores candidatos são *DAPK1*, *RASSF1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *MGMT*, *RAR $\beta$* , *APC*, *FHIT*, *MLH1*, *TIMP3*, *GSTP1*, *CADM1*, *CDH13*, *HIC1* e *TERT* (Wentzensen *et al.*, 2009).

### 2-3 Biomarcadores

Mais de 80 genes têm sido estudados como possíveis biomarcadores para o câncer cervical (Wentzensen *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2010; Brebi *et al.*, 2014; Brentnall *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2014). Até o momento não há nenhum biomarcador que atenda aos requisitos citados acima e alguns grupos propuseram a utilização de painéis de genes metilados com a finalidade de melhorar o rastreio do câncer cervical. *CDH1*, *FHIT*, *TERT*, *CDH13*, *MGMT*, *TIMP3*, *HIC1* foram detectados em mais de 60% dos estudos em cânceres cervicais (Wentzensen *et al.*, 2009).

Feng *et al.* (2005) demonstraram 74% de sensibilidade e 95% de especificidade na detecção de câncer cervical, utilizando um painel de metilação de três genes: *DAPK1*, *RAR $\beta$*  e *TWIST1*.

A literatura sobre hipermetilação de genes no câncer cervical é limitada assim como nas NICs. Os genes escolhidos neste estudo foram aqueles para os quais havia evidência de um papel da hipermetilação na progressão da NIC já descrito por outros autores (Virmani *et al.*, 2001; Widschwendter, Gatringer, *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005) (QUA.1).

#### Quadro 1- Biomarcadores incluídos no estudo

Nome dos genes supressores de tumor		Função do gene
<b><i>MGMT</i></b>	<i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	Reparo DNA
<b><i>CDH1</i></b>	<i>Cadherin 1</i>	Adesão celular
<b><i>TIMP3</i></b>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases3</i>	Angiogênese

### **2-3-1 MGMT (Metiltransferase de DNA-O-6-metilguanina)**

É uma proteína reparadora do DNA que protege o genoma humano de carcinógenos endógenos. Agentes alquilantes podem levar a mutações no DNA. A principal via de reparação do DNA ocorre através da ação da *MGMT*. Assim, a falta de atividade enzimática ou expressão da *MGMT* pode resultar em mutações no DNA promovendo a carcinogênese, bem como torna os tumores mais sensíveis a algumas drogas alquilantes usadas em quimioterapia, enquanto sua maior expressão pode ocasionar quimioresistência (Sharma *et al.*, 2009). Baixa expressão de *MGMT* está relacionada à hipermetilação. A metilação de *MGMT* foi encontrada nos tumores de colon, pulmão, leucemias, linfomas, esôfago, estômago e pâncreas (Esteller *et al.*, 2001; Pluta *et al.*, 2006). A expressão de *MGMT* é variável e dependente do tipo de tumor, estando menos presente nos melanomas e tumores cerebrais e mais expressos nos tumores de ovário e mama. Há pouca informação sobre o seu papel na carcinogênese cervical (Margison *et al.*, 2003; Esteller e Herman, 2004; Jacinto e Esteller, 2007).

### **2-3-2 CDH1 (E- caderina)**

É uma glicoproteína transmembrana, cálcio dependente e um dos principais constituintes do complexo de adesão celular nas células epiteliais, sendo um gene supressor de tumor (Gumbiner, 2005; Koriyama *et al.*, 2007). Desempenha um importante papel no crescimento celular e na integridade e arquitetura do tecido (Chen *et al.*, 2003), assim como na invasão tumoral e metástases (Chen *et al.*, 2003; Hawes *et al.*, 2010). A metilação de *CDH1* foi encontrada nas leucemias, tumores de mama, esôfago, tireoide e estômago (Esteller *et al.*, 2001; Pluta *et al.*, 2006).

### **2-3-3 TIMP3 (Inibidor de metaloproteinase 3)**

O desenvolvimento do tumor e a ocorrência de metástases tumorais dependem de vascularização. Proteínas angiogênicas, como fator de crescimento endotelial vascular A (*VEGF-A*) e fator de crescimento de fibroblastos básicos (*bFGF*), são secretados por tumores para iniciar angiogênese estimulando a degradação da membrana basal capilar, promovendo assim migração celular endotelial e

proliferação (Folkman, 2007). Na fase inicial da angiogênese ocorre degradação de matriz extracelular por proteínas da família metaloproteinases de matriz (MMP). Assim tanto as MMP como seus inibidores exercem importante papel no crescimento e invasão tumoral, metástases e angiogênese (Rundhaug, 2003; Nagase *et al.*, 2006; Hawes *et al.*, 2010). *TIMP3* é um potente inibidor de MMP, conseqüentemente de angiogênese e desenvolvimento tumoral, levando a apoptose (Ahonen *et al.*, 1998; Airola *et al.*, 1998) o que indica poder suprimir alterações precoces do desenvolvimento tumoral (Anand-Apte *et al.*, 1997; Benezra, 1997). Sua não expressão é um evento comum em tumores sólidos e em metástases através do aumento da atividade das MMPs (Shinojima *et al.*, 2012). A metilação de *TIMP3* foi encontrada nos tumores de cólon (Esteller *et al.*, 2001; Pluta *et al.*, 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3-1 Geral**

Avaliar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* como fatores preditivos para a recidiva de NIC.

#### **3-2 Específicos**

- Avaliar se o perfil de metilação das ilhas CpG destes genes está relacionado com o grau da NIC.
- Avaliar se a presença da infecção pelo HIV altera o perfil de metilação das ilhas CpG destes genes.
- Avaliar fatores de risco para recidiva de NIC.

## 4 PACIENTES E MÉTODO

### 4-1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo caso-controle aninhado a uma coorte, a partir de peças de conização do colo uterino apresentando NIC, por cirurgia de alta frequência (CAF), de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, que apresentaram recidiva da lesão (casos) ou não (controles).

As mulheres infectadas pelo HIV foram oriundas do Setor de Ginecologia do Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas (CTR-DIP Orestes Diniz).

As mulheres não infectadas pelo HIV foram oriundas do Posto de Atendimento da Sagrada Família – Serviço de Patologia do Colo, Prefeitura Municipal de Belo Horizonte.

Todas as mulheres foram submetidas à CAF, no período entre janeiro de 1999 e maio de 2004, por apresentarem algum grau de NIC. O período médio de acompanhamento foi de dois anos. Definiu-se, na ocasião, como recidiva de lesão o aparecimento ou a persistência de NIC, identificada por alteração citológica e/ou colposcópica, sempre confirmada por biópsia, considerada padrão ouro na análise e independente do tempo decorrente da primeira conização.

As peças parafinadas que foram encontradas em estoque nos laboratórios de anatomia patológica foram recrutadas para serem estudadas por *methylation-specific quantitative PCR* (MSQP), para avaliar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes.

### 4-2 Pacientes

Foram analisados blocos parafinados, pós conização de 74 mulheres infectadas pelo HIV (25 com recidiva de NIC e 49 sem recidiva) e de 73 mulheres não infectadas pelo HIV (8 com recidiva e 65 sem recidiva de NIC). Todas apresentavam biópsia

compatível com NIC e foram submetidas à conização por CAF, tendo apresentado ou não recidiva de lesão, após o seguimento pós operatório. Ao final, somaram-se 33 casos (mulheres com recidiva de NIC) e 114 controles (mulheres sem recidiva de NIC), todos independentemente da sorologia para o HIV.

Todos os blocos de parafina das 147 mulheres foram obtidos a partir do levantamento de seus números de registro no Posto de Atendimento da Sagrada Família – Serviço de Patologia do Colo, onde elas foram submetidas à CAF. Encontravam-se estocados nos laboratórios Tafuri de Patologia e Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatologia da Regional Noroeste – SMSA/PBH, que eram os laboratórios de referência do serviço na época. Foram então encaminhados ao Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), para serem estudados quanto ao perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT*.

As análises foram feitas utilizando o *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 17.0.

#### **4-3 Critérios de inclusão**

Foram incluídas as peças parafinadas de mulheres que concordaram em participar dos estudos anteriores (Lima, 2005; Lodi, 2009) e que assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), permitindo realizar estudos biomoleculares que os pesquisadores julgassem apropriados, com o intuito de buscar novas estratégias para a prevenção do câncer cervical e que apresentavam algum grau de NIC no bloco parafinado, confirmado por novo exame histopatológico.

#### **4-4 Critérios de exclusão**

Foram excluídos os blocos parafinados com material insuficiente para o estudo e que não apresentavam mais NIC, confirmado por novo exame histopatológico.

## **4-5 Método**

### **4-5-1 Teste de triagem sorológica para o HIV**

Todas as mulheres incluídas no estudo, infectadas ou não pelo HIV, possuíam teste sorológico positivo ou negativo, respectivamente, segundo a Portaria nº 488, de 17 de junho de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, na época em que foram submetidas à CAF (ANEXO D).

### **4-5-2 Conização por CAF**

Todas as mulheres foram submetidas à CAF no bloco cirúrgico do Posto de Atendimento Médico (PAM) Sagrada Família, nos moldes de uma pequena cirurgia, no período de 1999 a 2004, por apresentarem biópsia compatível com NIC I, II ou III. A maioria das biópsias com resultado NIC I fazia parte do grupo de mulheres infectadas pelo HIV.

A histopatologia da biópsia na época da CAF foi baseada na classificação proposta por Richart (1973) (ANEXO E) e a terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical seguiu a orientação de Wright *et al.*(1994) baseada na classificação de Richart (1973) (ANEXO F).

O aparelho utilizado foi o *Wavetronic* 2000 acoplado ao aspirador de fumaça. Em todo o procedimento foi retirada a junção escamocolunar (JEC) e quando ela não foi visualizada, ou quando se tratava de NIC III, o procedimento foi completado com o uso da alça de canal para estudo adequado da JEC, com a preocupação de obter-se margem endocervical negativa para a neoplasia.

O material obtido foi introduzido em frasco contendo solução de formaldeído a 10%, com volume correspondendo a pelo menos 10 vezes o volume do espécime cirúrgico. A seguir, foi enviado para o laboratório onde foi incluído em um ou mais blocos de parafina. Permaneceram estocados por um período variável de 12 a 17 anos.

### 4-5-3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do HPV

A detecção do HPV foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), usando um *primer consensus* para cada grupo de baixo e alto risco, incluindo os tipos de HPV 6,11 (baixo risco) e 16, 18, 31, 33 e 35 (alto risco), por serem os mais prevalentes (Gök *et al.*, 2007; Thomison *et al.*, 2008), em estudo realizado anteriormente (Lodi, 2009) (QUA. 2).

### Quadro 2- Sequência de *primers* para detecção DNA-HPV

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'
HPV baixo risco F	TACACTGCTGGACAACATGC
HPV baixo risco R	GTGCGCAGATGGGACACAC
HPV alto risco F	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
HPV alto risco R	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC

### 4-5-4 Análise microscópica

Foi selecionado um bloco de parafina de cada caso e controle para ser enviado ao laboratório IPON (Faculdade de Medicina da UFTM), aquele que apresentava NIC com maior grau de lesão, segundo nova análise realizada por um único patologista. Em um segundo momento, foram realizados novos cortes em micrótomo para obter material para extração do DNA e realização da MSQP. Os cortes para análise microscópica foram feitos antes e depois do material retirado para a realização dos ensaios, visando certificar-se da presença ainda de NIC, de qualquer grau, no material. Nessa fase, os critérios microscópicos foram reavaliados novamente por um único patologista. Toda a análise foi cega para o conhecimento da infecção ou não pelo HIV e também para o conhecimento de recidiva ou não de lesão.

### 4-5-5 Extração de DNA das amostras parafinadas

Para a desparafinação e extração do DNA foi utilizado o *ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System* (QIAGEN) conforme orientação do fabricante. De cada bloco parafinado selecionado foram feitos, em micrótomo, dez cortes de 5 µm e

transportados para microtubos de 1,5 mL. Adicionados 300 µl de óleo mineral e incubado a 80°C por 1 minuto. Posterior agitação no vórtex.

Para lise da amostra, foram adicionados 200 µl de tampão de lise e centrifugado a 10000 g durante 15 segundos à temperatura ambiente, formando duas fases, uma inferior, aquosa e uma superior, oleosa. Posteriormente foram adicionados 20 µl de Proteinase K na fase inferior e misturado por pipetagem. Incubado a 56°C por 1 hora e a 80°C por mais 1 hora. A amostra foi resfriada à temperatura ambiente e centrifugada brevemente. Em seguida, foram adicionados 10 µl de RNAase A, misturando a fase inferior por pipetagem. Novamente foi incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. Adicionados 220 µl de Tampão BL para cada amostra e 240 µl de etanol (95-100%) e levado ao vórtex brevemente para misturar. Centrifugado a 10000 g por 15 segundos à temperatura ambiente, formando novamente duas fases uma inferior, aquosa e outra superior, oleosa.

Em seguida, a fase inferior aquosa da amostra foi transferida, para a coluna de ligação/tubo coletor, descartando o óleo mineral restante. Após centrifugação a 10000 g por 30 segundos à temperatura ambiente, o volume do tubo coletor foi descartado. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de solução de lavagem 1X (com etanol adicionado), centrifugado a 10000 g por 30 segundos à temperatura ambiente, e descartado o filtrado. Repetida a lavagem, em seguida o tubo foi centrifugado com a tampa da coluna aberta a 16000 g por 3 minutos à temperatura ambiente, para secar. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e descartado o tubo de coleta. Em seguida, 50 µl de tampão de eluição foram adicionados à coluna; centrifugado a 16000g por 1 minuto à temperatura ambiente e armazenado o DNA eluído a -20°C.

#### **4-5-6 Quantificação do DNA na amostra**

Para a quantificação do DNA, 1 µl de *Qubit™ Reagent* 1:200 foi adicionado a 199 µl de *Qubit™ Buffer*, formando uma solução de trabalho. Em um microtubo foi adicionado 1 µl da amostra a 199 µl da solução acima, misturada com vórtex por 3 segundos e incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 2 minutos. Em seguida foi feita a quantificação no *Qubit 2.0 Fluorômetro*.

#### 4-5-7 Ensaio de conversão do DNA com bissulfito de sódio

Foi utilizado o *MethylEdge™ Bisulfite Conversion System* (PROMEGA). Em tubos de PCR de 200 µl foram colocados 130 µl de Reagente ME de Conversão Bissulfito ME e 20 µl de cada amostra de DNA extraído, pipetando para misturar. Centrifugado brevemente para depositar a amostra no fundo do tubo. Em seguida foi levada ao termociclador para incubar por 8 minutos a 98°C, em seguida 60 minutos a 54°C e finalmente a 4°C.

Para cada amostra foi colocada uma coluna *ME Spin* em cada tubo de coleta. Adicionados 600 µl de tampão *ME Binding* à coluna. Transferidas as amostras tratadas com bissulfito para a coluna e então misturado invertendo várias vezes. Centrifugado a 10000 g por 30 segundos. Descartado o fluido do tubo coletor e então foram adicionados 100 µl de tampão *ME Wash* (24 ml de etanol + 6 ml de *MEWash Solution*) e centrifugado novamente a 10000 g por mais 30 segundos. Em seguida foram colocados 200 µl de tampão dissulfonado ME para cada coluna e incubado a 25°C por 15 minutos e imediatamente depois centrifugado a 10000 g por 30 segundos. Na lavagem foram adicionados 200 µl de tampão de lavagem ME e centrifugado a 10000 g por 30 segundos. Esta lavagem foi repetida mais uma vez. Após foi colocado a coluna em tubo eppendorf limpo de 1,5 mL e adicionados 10 µl de solução de eluição ME e centrifugado a 10000g por 30 segundos. Após foram adicionados 10 µl de água *free nuclease*. Descartada a coluna, o tubo foi estocado a -20°C, protegido da luz.

O tratamento do DNA com bissulfito resulta em deaminação da citosina transformando em uracil. A citosina metilada (5metil citosina) é resistente a este tratamento químico. Realizando a PCR no DNA tratado com bissulfito permite a identificação de regiões metiladas no DNA (Herman *et al.*, 1996).

Para determinar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3* foi realizada a técnica MSQP (Hattermann *et al.*, 2008), utilizando o *Kit QIAGEN (QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit)*. As reações foram executadas no *7900HT Fast Real 19 Time System® da Life Technologies, Software SDS* nas condições descritas nas tabelas 1 e 2. Duas reações de PCR são feitas para cada

amostra, uma usando iniciadores específicos (*primers*) para detectar DNA metilado e outra usando iniciadores específicos (*primers*) para detectar DNA não metilado. As sequências dos *primers*, de cada gene, podem ser vistas no quadro 3. Não foram feitas análises em duplicatas, devido à escassez de DNA extraído em cada amostra.

**Tabela 1- Reação Kit QIAGEN**

Reagentes	Concentração do estoque	Concentração final
<i>SYBR Green PCR Master Mix</i>		1x
<i>QN ROX Reference Dye</i>	30 $\mu$ M	1x
<i>Primer A</i>	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M
<i>Primer B</i>	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M
<i>Rnase - free water</i>		
Amostra		$\leq$ 100 ng/reacção

$\mu$ M- micromolar; ng - nanograma

Seguindo as condições de ciclagem de temperatura à 95° C por 2 min para desnaturação inicial e 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, sendo que as condições de temperatura de anelamento, assim como o volume das soluções para cada sequência iniciadora, foram otimizados por prévias padronizações realizadas no IPON (TAB. 2). Finalmente foi realizada uma curva de dissociação conforme orientação do fabricante.

**Tabela 2- Volume de amostra e *primers*, concentração do estoque e da reação e condições de temperatura de anelamento em cada reação.**

Gene Alvo	Volume Primer	Volume amostra	Concentração estoque	Concentração reação	Temperatura de Anelamento
<b>TIMP3 M</b>	1 µl	1 µl	10 µM	1 µM	95°C/30 seg - 60°C /45 seg
<b>TIMP3 NM</b>	1,5 µl	1,5 µl	10 µM	1 µM	95°C /30 seg - 60°C /45 seg
<b>CDH1 M</b>	1,5 µl	1,5 µl	10 µM	1 µM	95°C /30 seg - 60°C /45 seg
<b>CDH1 NM</b>	1 µl	1 µl	10 µM	1 µM	95°C /15 seg - 60°C /30 seg
<b>MGMT M</b>	1 µl	1 µl	10 µM	1 µM	95°C /15 seg - 60°C /60 seg
<b>MGMT NM</b>	1 µl	1 µl	10 µM	1 µM	95°C /15 seg - 60°C /30 seg

M - metilado; NM - não metilado; seg- segundos; °C graus centígrados; µl -microlitro; µM micromolar

**Quadro 3- Sequência dos *primers* dos genes em estudo**

Gene	Sequência <i>primers</i> 5' – 3'
<b>MGMT Não metilado F</b>	<b>TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT</b>
<b>MGMT Não metilado R</b>	<b>AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA</b>
<b>MGMT Metilado F</b>	<b>TTTCGACGTTCTGTACCTTTTCGC</b>
<b>MGMT Metilado R</b>	<b>GCACTCTTCCGAAAACGAAACG</b>
<b>TIMP3 Não metilado F</b>	<b>TTTTGTTTTGTTATTTTTTGTTTTTGGTTTT</b>
<b>TIMP3 Não metilado R</b>	<b>CCCCC AAAA ACCC CACCTCA</b>
<b>TIMP3 Metilado F</b>	<b>CGTTTCGTTATTTTTTGTTCGGTTTTTC</b>
<b>TIMP3 Metilado R</b>	<b>CCGAAAACCCCGCCTCG</b>
<b>CDH1 Não metilado F</b>	<b>TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT</b>
<b>CDH1 Não metilado R</b>	<b>CACAACCAATCAACAACACA</b>
<b>CDH1 Metilado F</b>	<b>TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT</b>
<b>CDH1 Metilado R</b>	<b>TAACTAAAATTACCTACCGAC</b>

A integridade da amostra de DNA foi inferida pela amplificação da  $\beta$  actina considerada como controle endógeno, por ser um gene expresso constitutivamente (Livak e Schmittgen, 2001; Morse *et al.*, 2005).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável resposta principal é a ocorrência de recidiva de lesão em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV e as covariáveis independentes são: infecção pelo HIV, o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT*, variáveis clínicas (margem e ocupação glandular na CAF, citologia, colposcopia, biópsia e anatomopatológico da CAF, resultado do HPV) e variáveis sociodemográficas (idade, paridade, tabagismo, idade de início de atividade sexual, número de parceiros). Foi utilizado o cálculo amostral realizado em estudo anterior (Lodi, 2009), devido à escassez de informações na literatura em relação a este tema. Os dados foram armazenados e analisados no SPSS 17.0.

### 5-1 Cálculo amostral

A variável resposta principal foi a ocorrência de recidiva de lesão em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV e as covariáveis: resultado do HPV, tipo de HPV (alto e/ou baixo risco), margem e ocupação glandular na CAF, idade da paciente, paridade, tabagismo, idade de início de atividade sexual, número de parceiros, citologia, colposcopia, biópsia e anatomopatológico da CAF. Baseando-se em dados da literatura, estimou-se a proporção de pacientes com recidiva em cada estrato, que consiste da combinação do resultado de HIV, da recidiva e da classificação do resultado do HPV. A partir do *software* StatXact, foi calculado o poder do teste de *Wilcoxon* (método de *mid rank*) para comparar duas distribuições multinomiais com variáveis categóricas com ordenação. Entre as várias situações simuladas, foi escolhido o tamanho de amostra que correspondia ao poder de 90% (Lodi, 2009).

**Pacientes HIV + (N=94)**

RECIDIVA	HPV -	HPV + (Baixo risco)	HPV + (Alto risco)	
Não (N=63)	0,20	0,70	0,10	
Sim (N=31)	0,10	0,35	0,55	
n(recidiva)	n(não recidiva)	n(total)	Poder (%)	
15	35	50	93%	
16	34	50	93%	
17	33	50	94%	
18	32	50	94%	
19	31	50	94%	
20	30	50	94%	
16	31	47	92%	
15	30	45	91%	
<b>14</b>	<b>29</b>	<b>43</b>	<b>90%</b>	
13	28	41	88%	
12	27	39	86%	
11	26	37	84%	
10	25	35	81%	
10	24	34	80%	
09	24	33	77%	

**Pacientes HIV - (N=107)**

RECIDIVA	HPV-	HPV + (Baixo risco)	HPV + (Alto risco)	
Não (N=98)	0,60	0,30	0,10	
Sim (N=09)	0,10	0,35	0,55	
n(recidiva)	n(não recidiva)	n(total)	Poder (%)	
09	31	40	97%	
08	32	40	96%	
07	33	40	94%	
06	34	40	91%	
05	35	40	86%	
09	15	24	93%	
09	14	23	92%	
09	13	22	91%	
09	12	21	90%	
09	11	20	89%	
08	15	23	91%	
08	14	22	90%	
08	13	21	89%	
08	12	20	88%	
08	11	19	87%	
<b>05</b>	<b>54</b>	<b>59</b>	<b>90%</b>	
05	40	45	89%	
05	30	35	87%	
05	25	30	86%	
05	20	25	85%	

## **5-2 Análise univariada**

### **5-2-1 Análise univariada descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV**

Comparação entre os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, a partir de análise de mediana usando-se teste *U-Mann-Whitney* para variáveis contínuas. Estas foram transformadas em categóricas e, assim, fez-se análise univariada empregando-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* e teste exato de *Fisher* para as variáveis idade, paridade, idade de início de vida sexual, número de parceiros, tabagismo, resultado da citologia oncótica, avaliação colposcópica, resultado de biópsia, anatomopatológico da CAF, sinais de HPV no bloco, PCR para detecção DNA-HPV, avaliação de margens cirúrgicas, avaliação de ocupação glandular, recidiva de lesão e perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT*, para verificar se os grupos eram ou não homogêneos. O nível de confiança estatística de 0,05 foi utilizado para todas as análises.

### **5-2-2 Análise do perfil de metilação, das ilhas CpG, dos genes em relação ao grau de NIC**

Análise univariada, do perfil de metilação das ilhas CpG dos genes, em relação ao grau de NIC, usando o teste do Qui-quadrado de *Pearson* e teste exato de *Fisher*.

### **5-2-3 Análise univariada dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV em relação à recidiva ou não de NIC**

Análise univariada dos casos (peças que recidivaram) e controles (peças que não recidivaram) foi realizada usando-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* e teste exato de *Fisher* para todas as variáveis categóricas já citadas. Considerou-se o nível de significância de 0,05. Foi calculado o índice de metilação, definido como o número total de genes metilados dividido pelo total de genes estudados, em cada amostra e em seguida foi calculada a mediana do índice de metilação em cada grupo. As variáveis que apresentaram  $p < 0,25$  nesta fase foram levadas para um modelo multivariado por regressão logística.

### **5-3 Análise multivariada**

Foi realizada a análise multivariada por regressão logística, para estudo final de associação entre as variáveis significantes e recidiva de NIC. Todas as variáveis com valor  $p < 0,25$  na análise univariada foram incluídas no modelo. Em seguida, aquelas com baixo nível de significância (valor p mais alto) foram retiradas até que restassem apenas as com significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, plataforma Brasil, parecer nº 1.182.951 (ANEXO A).

As mulheres envolvidas neste estudo fizeram parte de estudos anteriores aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), parecer nº 239/07 (ANEXO B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (CEP-SMSA/PBH), protocolo nº 060/2007 (ANEXO C).

Todas as mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (APÊNDICE A).

## 7 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em duas etapas: a primeira mostrando os resultados laboratoriais e a segunda os resultados das análises estatísticas.

### 7-1 Resultados laboratoriais

A quantificação do DNA em cada amostra, foi feita no Quebit 2.0 Flurorômetro e os valores de leitura podem ser vistos na Tabela 3.

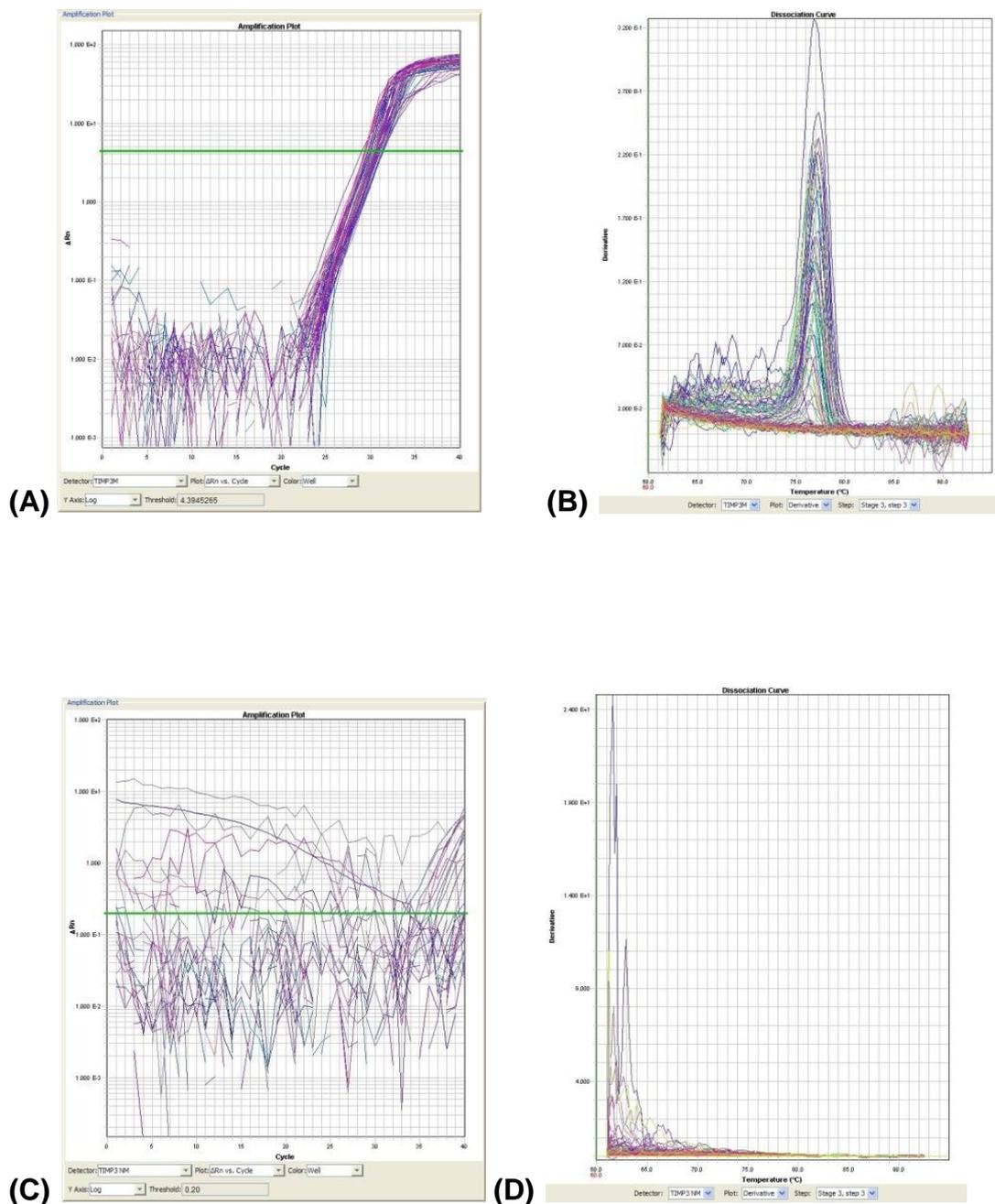
**Tabela 3- Quantificação do DNA das amostras**

DNA	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Percentil		
					25	50	75
ng/ $\mu$ L	21,49	17,60	0,50	99,80	7,77	17,60	29,40

ng- nanograma ;  $\mu$ L- microlitro

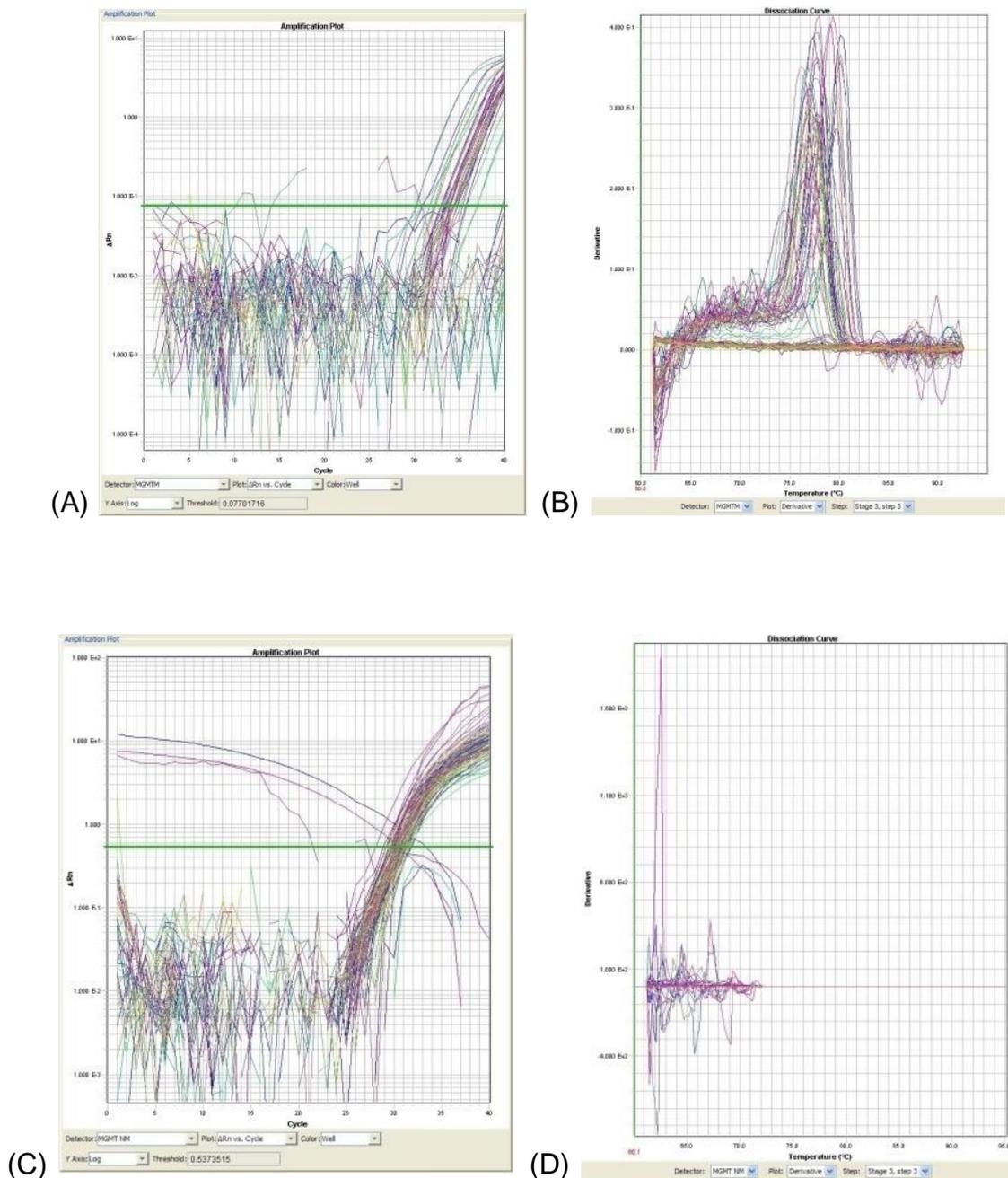
Para cada amostra, obteve-se uma curva de amplificação e uma de dissociação, específicas para cada gene e para o controle endógeno,  $\beta$ -actina na MSQP (FIG. 5 a 8).

Figura 5- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene *TIMP3* metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene *TIMP3* não metilado.



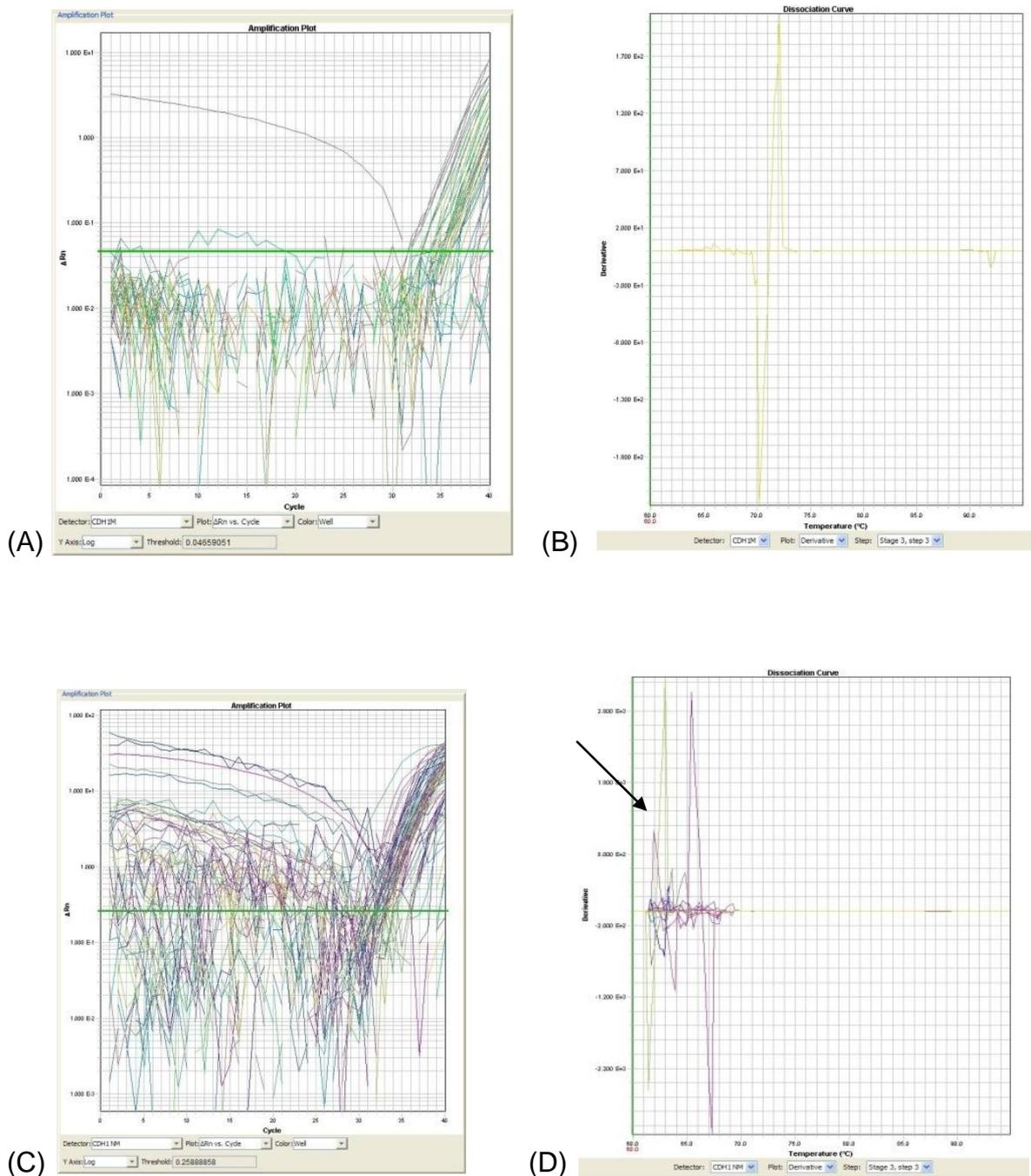
Nas curvas de dissociação observa-se a presença de um único pico que corresponde à formação de um único produto na MSQP.

Figura 6- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene *MGMT* metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene *MGMT* não metilado.



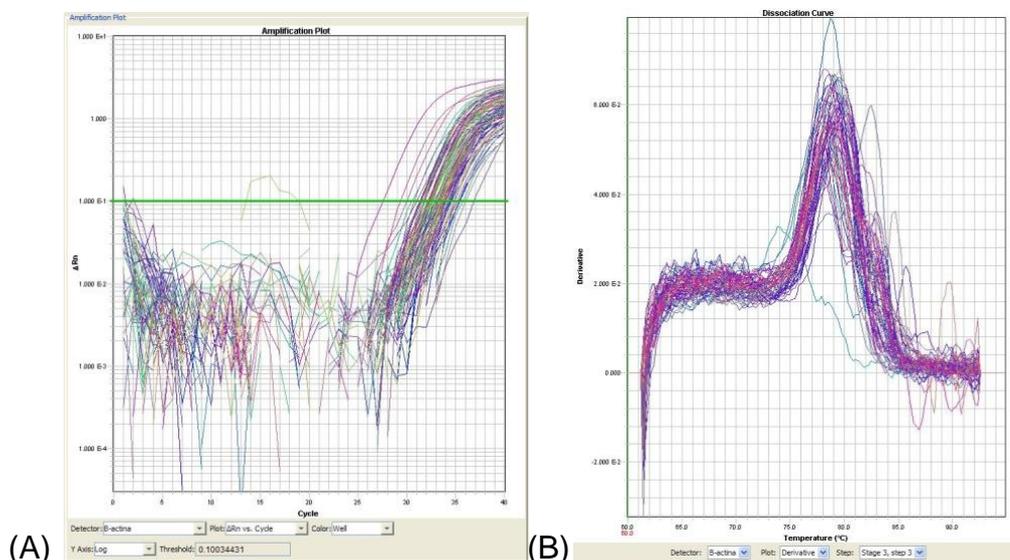
Nas curvas de dissociação observa-se a presença de um único pico que corresponde à formação de um único produto na MSQP.

Figura 7- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP do gene *CDH1* metilado e curva de amplificação (C) e de dissociação (D) do gene *CDH1* não metilado.



A seta indica a presença de um pico com temperatura de dissociação inferior a 65 $^{\circ}\text{C}$  geralmente associada à dimerização de iniciadores.

**Figura 8- Curva de amplificação (A) e de dissociação (B) da reação de MSQP da  $\beta$  actina**



Nas curvas de dissociação observa-se a presença de um único pico que corresponde à formação de um único produto na MSQP.

## 7-2 Resultados das análises estatísticas

Foram analisadas 74 peças parafinadas de mulheres infectadas pelo HIV e 73 de não infectadas, totalizando 147 peças. A análise dos resultados foi dividida em três etapas, sendo a primeira univariada, descritiva, incluindo os grupos das mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, a segunda univariada incluindo os genes e o grau de NIC e a terceira uni e multivariada em relação à recidiva (n=33) ou não de NIC (n=114).

As mulheres infectadas pelo HIV apresentavam uma mediana de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de 280 células/mm<sup>3</sup>, (variação de 23 a 807 células/mm<sup>3</sup>). Vinte e três (31%) mulheres apresentavam linfócitos T CD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> no momento da cirurgia. Todas faziam uso de terapia antiretroviral de alta eficácia (HAART) no momento da CAF e apresentavam mediana de carga viral 4.981 cópias/mL (variação de 1 a 8.317.637 cópias/mL) (APÊNDICE B).

### 7-2-1 Resultados da análise univariada descritiva dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV.

Verificou-se a homogeneidade dos grupos e não foi observada diferença significativa entre eles quanto à idade, paridade e idade de início de atividade sexual. Quanto à idade, a mediana foi 33 anos nas infectadas pelo HIV e 34 anos nas não infectadas ( $p=0,12$ ); o número de parceiros apresentou mediana de 3 nas infectadas pelo HIV e 2 nas não infectadas, excluindo-se 42 mulheres que não informaram ( $p=0,03$ ) (TAB. 4).

**Tabela 4- Comparação da mediana entre as variáveis sociodemográficas, segundo a infecção pelo HIV**

	Infectadas HIV (n=74)	Não infectadas HIV (n=73)	Valor p*
	Mediana (A)	Mediana (A)	
<b>Idade</b>	33 (20 - 55)	34 (18 - 71)	0,12
<b>Paridade</b>	2 (0 - 11)	2 (0 - 10)	0,15
<b>Início vida sexual</b>	17 (13 - 29)	18 (13 - 22)	0,36
<b>Número parceiros**</b>	3 (1 - 5)	2 (1 - 5)	0,03

\* Teste *U-Mann-Whitney* - valor p para mediana; A- amplitude

\*\* excluídos 24 casos infectadas HIV e 18 não infectadas, sem informação

Quanto às variáveis sociodemográficas, considerando como ponto de corte a mediana de cada uma, não se encontrou diferença significativa entre os grupos em relação à idade, tabagismo, paridade e idade de início de vida sexual. O tabagismo foi levado em consideração apenas se a paciente era ou não fumante no momento da consulta. Em relação ao número de parceiros, a maioria das mulheres infectadas pelo HIV tiveram 3 ou mais parceiros sexuais (44,6%), enquanto as não infectadas no máximo 2 parceiros sexuais (41,1%), sendo significativa a diferença entre os grupos ( $p= 0,03$ )(TAB. 5).

**Tabela 5- Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a infecção pelo HIV.**

	Infectadas HIV (n=74)		Não Infectadas HIV (n=73)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
<b>Idade</b>							
< 33 anos	37	50,0	30	41,1	0,28	1,4	0,75 – 2,75
≥ 33 anos	37	50,0	43	58,9		1,0	
<b>Tabagismo</b>							
Fumante	27	36,5	28	38,4	0,82	0,92	0,47 – 1,80
Não fumante	47	63,5	45	61,6		1,0	
<b>Número de Parceiros</b>							
≥ 3	33	44,6	25	34,2	0,03	2,3	1,06 – 5,13
< 3	17	23,0	30	41,1		1,0	
Perdas**	24	32,4	18	24,7			
<b>Paridade</b>							
≥ 2	27	36,5	36	49,3	0,12	0,59	0,31 – 1,14
< 2	47	63,5	37	50,7		1,0	
<b>Início da vida sexual</b>							
< 17 anos	32	43,2	22	30,1	0,10	1,8	0,90 – 3,48
≥ 17 anos	42	56,8	51	69,9		1,0	

\*Teste Qui-quadrado *Pearson* ; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança

\*\* Excluídas 42 pacientes que não informaram o número de parceiros

Na tabela 6 pode-se avaliar os exames realizados no pré e pós operatório. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à citologia oncótica realizada no pré operatório, tendo sido excluídos da análise cinco casos de atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ( $p=0,21$ ).

A colposcopia, a biópsia, também realizadas no pré operatório e o resultado do grau de NIC encontrado na CAF, apresentaram lesão de maior grau nas mulheres não infectadas pelo HIV, com predomínio de NIC II/III neste grupo, com diferença significativa quando comparadas às mulheres infectadas ( $p= 0,000$ ). Embora 55 (74,3%) mulheres infectadas pelo HIV apresentem NIC I na biópsia cervical, quando foram submetidas à CAF, 35 (47,3%) tiveram o diagnóstico histopatológico de NIC II/III.

Quanto às características histopatológicas do cone cervical não houve diferença significativa entre os grupos e 10 casos foram excluídos da análise, por não ter sido possível avaliar as margens cirúrgicas da peça operatória, que apresentavam os bordos queimados.

A PCR para detecção do DNA HPV foi realizada em 131 peças, pesquisando os tipos 6,11 de baixo risco e 16, 18, 31,33 e 35 de alto risco e não houve diferença significativa entre os grupos, embora o HPV de alto risco estivesse presente em mais de 70% dos casos avaliados ( $n = 68$ ). Foram excluídos 16 casos onde não foi possível fazer a PCR para o HPV.

**Tabela 6- Comparação entre os exames propedêuticos, segundo a infecção pelo HIV.**

	Infectadas HIV (n=74)		Não infectadas HIV (n=73)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
<b>Citologia</b>							
Alterada	48	64,9	52	71,2	0,21**	0,63	0,30 - 1,30
Normal	25	33,8	17	23,3		1,0	
Asc-us	1	1,3	4	5,5			
<b>Colposcopia</b>							
Grau II	25	33,8	60	82,2	0,000	0,11	0,05 – 0,24
Grau I	49	66,2	13	17,8		1,0	
<b>Biópsia</b>							
NIC II/III	19	25,7	61	83,6	0,000	0,07	0,03 – 0,15
NIC I	55	74,3	12	16,4		1,0	
<b>CAF</b>							
NIC II/III	35	47,3	60	82,2	0,000	0,19	0,09 – 0,41
NIC I	39	52,7	13	17,8		1,0	
<b>Margem cirúrgica</b>							
Comprometida	18	24,3	13	17,8	0,43	1,39	0,62 – 3,11
Livre	53	71,6	53	72,6		1,0	
Perda***	3	4,1	7	9,6			
<b>Ocupação</b>							
<b>Glandular</b>							
Presente	11	14,9	6	8,2	0,21	1,95	0,68 – 5,59
Ausente	63	85,1	67	91,8		1,0	
<b>PCR HPV</b>							
HPV positivo	39	52,7	29	39,7	0,20*	1,58	0,79 – 3,14
HPV negativo	29	39,2	34	46,6		1,0	
Perda****	6	8,1	10	13,7			
<b>TIPO HPV *****</b>							
Alto risco	29	74,4	23	79,3	0,63*	0,76	0,24 – 2,39
Baixo risco	10	25,6	6	20,7		1,0	

\* Teste Qui-quadrado *Pearson*; OR - *odds ratio*; IC –intervalo de confiança

\*\*valor p excluindo 5 casos de ASC-US

\*\*\*excluídos 10 casos sem avaliação de margens cirúrgicas por apresentarem bordos queimados.

\*\*\*\*excluídos 16 casos que não tiveram resultado do exame

\*\*\*\*\* excluídos os 79 casos negativos na PCR (foram pesquisados os tipos 6,11,16,18,31,33,35)

Na tabela 7, encontram-se os genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* avaliados pela presença ou não de metilação, em relação aos grupos de mulheres infectadas ou não pelo HIV. Nesta avaliação os genes metilados e hemimetilados foram incluídos em um só grupo, considerado metilado. Na outra parte da tabela, os genes são avaliados separadamente, se metilados, hemimetilados ou não metilados.

Não houve diferença significativa, quanto à presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT*, entre os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Os genes *CDH1* e *TIMP3* metilados e *MGMT* não metilado estiveram presentes com maior frequência, tanto nas mulheres infectadas como nas não infectadas pelo HIV. Foram excluídos os casos onde não foram detectadas ampliações do s genes *CDH1* (16 casos), *TIMP3* (42 casos) e *MGMT* (4 casos).

Quando foi avaliado o perfil de metilação dos genes separadamente, se metilados, hemimetilados ou não metilados, também não houve diferença significativa entre os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV. Os genes *CDH1* e *MGMT* apresentaram uma frequência maior de hemimetilação, quando comparado ao de metilação, enquanto o gene *TIMP3* esteve metilado em mais de 78% das mulheres nos dois grupos (TAB.7).

Tabela 7- Perfil de metilação dos genes, segundo a infecção pelo HIV.

	Infectada HIV (n=74)		Não infectada HIV (n=73)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	43	60,6	39	65,0	0,60*	0,83	0,41 – 1,69
<b>NM</b>	28	39,4	21	35,0		1,0	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	40	85,1	55	94,8	0,11**	0,31	0,08 – 1,28
<b>NM</b>	7	14,9	3	5,2		1,0	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	31	43,7	30	41,7	0,81*	1,1	0,56 – 2,11
<b>NM</b>	40	56,3	42	58,3		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	16	22,5	17	28,3	0,73*		
<b>HM</b>	27	38,1	22	36,7			
<b>NM</b>	28	39,4	21	35,0			
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	37	78,7	50	86,2	0,23*		
<b>HM</b>	3	6,4	5	8,6			
<b>NM</b>	7	14,9	3	5,2			
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	1	1,4	1	1,4	0,97*		
<b>HM</b>	30	42,3	29	40,3			
<b>NM</b>	40	56,3	42	58,3			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança

M – metilado; HM – Hemimetilado; NM – não metilado

Excluídos casos que não foram detectadas amplificação dos genes (16 *CDH1*, 4 *MGMT*, 42 *TIMP3*)

Quando se observa o número de genes metilados em cada grupo, 63 (85,1%) mulheres infectadas pelo HIV apresentaram pelo menos um dos genes metilados, sendo que em 10 (13,5%) todos estavam presentes metilados. No grupo das mulheres não infectadas pelo HIV, 68 (93,2%) apresentaram pelo menos um gene metilado e em 13 (17,8%) todos estavam presentes metilados, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os grupos ( $p=0,42$ ) (TAB. 8).

**Tabela 8- Número de genes metilados, segundo a infecção pelo HIV.**

Número de genes metilados	Infectada HIV (n=74)		Não infectada HIV (n=73)	
	n	%	n	%
0	11	14,9	5	6,8
1	22	29,7	25	34,2
2	31	41,9	30	41,1
3	10	13,5	13	17,8

\*Teste Qui-quadrado; Valor  $p = 0,42$

### 7-2-2 Resultados da análise do perfil de metilação dos genes, em relação ao grau de NIC

Quanto à presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*, em relação ao grau de lesão da CAF, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de mulheres com NIC II/III (NIC de alto grau) e NIC I (NIC de baixo grau), independente se infectadas ou não pelo HIV (TAB.9).

*CDH1* metilado esteve presente em 66,7% das mulheres com NIC II/III, sendo que o maior percentual referiu-se ao gene hemimetilado (40,5%) ( $p=0,42$ ); *TIMP3* metilado esteve presente em 90,9% dos casos de NIC II/III, sendo que em somente 7,6% esteve hemimetilado ( $p=0,98$ ). Por outro lado, *MGMT* não metilado esteve presente na maioria dos casos de NIC II/III (55,4%) como também dos casos de NIC I (60,8%) ( $p=0,72$ ) (TAB. 9).

Tabela 9- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, independente da infecção pelo HIV.

	NIC II/III (n=95)		NIC I (n=52)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M/HM</b>	56	66,7	26	55,3	0,20*	1,62	0,78 - 3,36
<b>NM</b>	28	33,3	21	44,7		1,0	
<b>TIMP3</b>							
<b>M/HM</b>	60	90,9	35	89,7	1,0**	1,14	0,30 – 4,33
<b>NM</b>	6	9,1	4	10,3		1,0	
<b>MGMT</b>							
<b>M/HM</b>	41	44,6	20	39,2	0,54*	1,25	0,62 – 2,50
<b>NM</b>	51	55,4	31	60,8		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M</b>	22	26,2	11	23,4	0,42*		
<b>HM</b>	34	40,5	15	31,9			
<b>NM</b>	28	33,3	21	44,7			
<b>TIMP3</b>							
<b>M</b>	55	83,3	32	82,1	0,98*		
<b>HM</b>	5	7,6	3	7,7			
<b>NM</b>	6	9,1	4	10,3			
<b>MGMT</b>							
<b>M</b>	1	1,1	1	2,0	0,72*		
<b>HM</b>	40	43,5	19	37,3			
<b>NM</b>	51	55,4	31	60,8			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*; ; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança

M – metilado; HM – Hemimetilado; NM – não metilado

Excluídos casos que não foram detectadas amplificação dos genes (16 *CDH1*, 4 *MGMT*, 42 *TIMP3*)

Analisando a presença ou não de metilação de cada um dos genes, *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3* em relação ao grau de lesão da CAF, separadamente, nas mulheres infectadas pelo HIV (TAB.10) e nas não infectadas (TAB.11), também não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos.

No entanto, nas mulheres infectadas pelo HIV com NIC II/III, *CDH1* esteve presente metilado em 69,7% dos casos, sendo que em 42,4% esteve hemimetilado ( $p= 0,33$ ) e *TIMP3* esteve presente totalmente metilado em 84,2% dos casos de NIC II/ III ( $p= 0,34$ ). *MGMT* também esteve presente com maior frequência (51,5%) nos casos de NIC II/III, no entanto totalmente hemimetilado ( $p= 0,25$ ) (TAB. 10).

Nas mulheres não infectadas pelo HIV, os genes *CDH1* (64,7%) e *TIMP3* (93,6%) metilados apresentaram maior frequência na NIC II/III, sendo que o *CDH1* apresentou maior percentual de hemimetilados (39,2%) ( $p= 0,45$ ) e *TIMP3* de metilados (83%). *TIMP3* esteve 100% metilado nas mulheres com NIC I ( $p= 0,34$ ). Por outro lado, *MGMT* não metilado esteve mais freqüente na NIC II/III (59,3%) ( $p= 0,81$ ) (TAB. 11).

Tabela 10- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV.

	NIC II/III (n=35)		NIC I (n=39)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	23	69,7	20	52,6	0,14	2,10	0,78 – 5,51
<b>NM</b>	10	30,3	18	47,4		1,0	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	16	84,2	24	85,7	1,0**	0,89	0,18 – 4,52
<b>NM</b>	3	15,8	4	14,3		1,0	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	17	51,5	14	36,8	0,21*	1,82	0,71 – 4,71
<b>NM</b>	16	48,5	24	63,2		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	9	27,3	7	18,4	0,33*		
<b>HM</b>	14	42,4	13	34,2			
<b>NM</b>	10	30,3	18	47,4			
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	16	84,2	21	75,0	0,34*		
<b>HM</b>	0	0	3	10,7			
<b>NM</b>	3	15,8	4	14,3			
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	0	0	1	2,6	0,25*		
<b>HM</b>	17	51,5	13	34,2			
<b>NM</b>	16	48,5	24	63,2			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*

M – metilado; HM – Hemimetilado; NM – não metilado; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança  
Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (3 *CDH1*, 27 *TIMP3*, 3 *MGMT*)

Tabela 11- Perfil de metilação dos genes, segundo o grau de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV.

	NIC II/III (n=60)		NIC I (n=13)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M/HM</b>	33	64,7	6	66,7	1,0**	0,92	0,20 – 4,11
<b>NM</b>	18	35,3	3	33,3		1,0	
<b>TIMP3</b>							
<b>M/HM</b>	44	93,6	11	100,0	1,0**		
<b>NM</b>	3	6,4	0	0			
<b>MGMT</b>							
<b>M/HM</b>	24	40,7	6	46,2	0,71*	0,80	0,23 – 2,68
<b>NM</b>	35	59,3	7	53,8		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M</b>	13	25,5	4	44,4	0,45*		
<b>HM</b>	20	39,2	2	22,2			
<b>NM</b>	18	35,3	3	33,3			
<b>TIMP3</b>							
<b>M</b>	39	83,0	11	100,0	0,34*		
<b>HM</b>	5	10,6	0	0			
<b>NM</b>	3	6,4	0	0			
<b>MGMT</b>							
<b>M</b>	1	1,7	0	0	0,81*		
<b>HM</b>	23	39,0	6	46,2			
<b>NM</b>	35	59,3	7	53,8			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*

M – metilado; HM – Hemimetilado; NM – não metilado; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança  
Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (13 *CDH1*, 15 *TIMP3*, 1 *MGMT*)

Considerando as mulheres com NIC II/III em relação às mulheres com NIC I, independente da infecção pelo HIV, 87 (91,6%) mulheres do grupo NIC II/III e 44 (84,6%) do grupo NIC I apresentaram pelo menos 1 gene metilado, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre eles ( $p= 0,30$ ) (TAB.12).

Analisando o número de genes metilados, quanto ao grau de NIC, separando os dois grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, verifica-se que em ambos, com NIC II/III, mais de 90% tiveram pelo menos um gene metilado. Por outro lado, no grupo com NIC I, 31 (79,5%) mulheres infectadas pelo HIV apresentaram pelo menos um gene metilado ( $p= 0,44$ ), enquanto que nas não infectadas, 13 (100%) apresentaram pelo menos um gene metilado ( $p=0,08$ ) (TAB.12).

Tabela 12- Número de genes metilados, segundo o grau de NIC.

Número de genes metilados	NIC II/III (n= 95)		NIC I (n= 52)		Valor p*
	n	%	n	%	
<b>INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV</b>					
<b>0</b>	8	8,4	8	15,4	0,30
<b>1</b>	30	31,6	17	32,7	
<b>2</b>	44	46,3	17	32,7	
<b>3</b>	13	13,7	10	19,2	
<b>INFECTADAS PELO HIV</b>					
	<b>(n=35)</b>		<b>(n=39)</b>		
<b>0</b>	3	8,6	8	20,5	0,44
<b>1</b>	12	34,3	10	25,6	
<b>2</b>	16	45,7	15	38,5	
<b>3</b>	4	11,4	6	15,4	
<b>NÃO INFECTADAS PELO HIV</b>					
	<b>(n=60)</b>		<b>(n=13)</b>		
<b>0</b>	5	8,3	0	0	0,08
<b>1</b>	18	30,0	7	53,8	
<b>2</b>	28	46,7	2	15,4	
<b>3</b>	9	15,0	4	30,8	

\*Teste Qui-quadrado de Pearson

Quanto à presença ou não de metilação de cada um dos genes, *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*, em relação aos três graus de lesão da CAF, separadamente, independente da infecção pelo HIV, também não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos. *CDH1* metilado esteve presente na maioria dos casos, principalmente hemimetilado, nos três graus de NIC (p= 0,50); *TIMP3* metilado esteve presente em mais de 77% dos casos (p= 0,96). Por outro lado, *MGMT* não metilado, foi mais freqüente, nos três graus de NIC (p= 0,80) (TAB.13).

Tabela 13- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, independente da infecção pelo HIV.

	NIC I (n=52)		NIC II (n=30)		NIC III (n=65)		Valor p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M/HM</b>	26	55,3	18	64,3	38	67,9	0,42
<b>NM</b>	21	44,7	10	35,7	18	32,1	
<b>TIMP3</b>							
<b>M/HM</b>	35	89,7	16	88,9	44	91,7	0,93
<b>NM</b>	4	10,3	2	11,1	4	8,3	
<b>MGMT</b>							
<b>M/HM</b>	20	39,2	11	37,9	30	47,6	0,56
<b>NM</b>	31	60,8	18	62,1	33	52,4	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b>CDH1</b>							
<b>M</b>	11	23,4	5	17,9	17	30,4	0,50
<b>HM</b>	15	31,9	13	46,4	21	37,5	
<b>NM</b>	21	44,7	10	35,7	18	32,1	
<b>TIMP3</b>							
<b>M</b>	32	82,1	14	77,8	41	85,4	0,96
<b>HM</b>	3	7,7	2	11,1	3	6,3	
<b>NM</b>	4	10,3	2	11,1	4	8,3	
<b>MGMT</b>							
<b>M</b>	1	2,0	0	0	1	1,6	0,80
<b>HM</b>	19	37,3	11	37,9	29	46,0	
<b>NM</b>	31	60,8	18	62,1	33	52,4	

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; M – metilado; HM- Hemimetilado; NM – não metilado ; Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (16 *CDH1*, 42 *TIMP3*, 4 *MGMT*)

Avaliando apenas as mulheres infectadas pelo HIV (TAB. 14), observa-se que *CDH1* metilado predominou nos três graus de NIC, sempre com um maior número de hemimetilados.

*TIMP3* esteve presente somente metilado nas mulheres infectadas pelo HIV, com NIC II (85,7%) e NIC III (83,3%), embora sem diferença significativa ( $p=0,98$ ).

*MGMT* esteve mais freqüente não metilado, nas mulheres infectadas pelo HIV com NIC I (63,2%) e NIC II (61,5%). No entanto nas mulheres com NIC III o perfil de metilação foi maior, com 60% do gene hemimetilado. Não foi detectado *MGMT* metilado nestas mulheres com NIC II e NIC III (TAB. 14).

Nas mulheres não infectadas pelo HIV (TAB. 15), também não foi encontrada diferença significativa comparando a freqüência de metilação dos genes com os três graus de NIC. *CDH1* predominou metilado, variando o percentual de hemimetilação nos três graus de NIC ( $p=0,53$ ).

*TIMP3* metilado esteve presente em 100% das mulheres não infectadas com NIC I, e acima de 70% nas mulheres com NIC II e NIC III ( $p=0,48$ ).

*MGMT* foi detectado apenas hemimetilado nas mulheres com NIC I e NIC II e metilado em somente 2,3% das mulheres com NIC III. Houve um predomínio deste gene não metilado nos três graus de lesão (TAB. 15).

Tabela 14- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV.

	NIC I (n=39)		NIC II (n=14)		NIC III (n=21)		Valor p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<i><b>CDH1</b></i>							
<b>M/HM</b>	20	52,6	9	69,2	14	70,0	0,34
<b>NM</b>	18	47,7	4	30,8	6	30,0	
<i><b>TIMP3</b></i>							
<b>M/HM</b>	24	85,7	6	85,7	10	83,3	0,98
<b>NM</b>	4	14,3	1	14,3	2	16,7	
<i><b>MGMT</b></i>							
<b>M/HM</b>	14	36,8	5	38,5	12	60,0	0,22
<b>NM</b>	24	63,2	8	61,5	8	40,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<i><b>CDH1</b></i>							
<b>M</b>	7	18,4	3	23,1	6	30,0	0,65
<b>HM</b>	13	34,2	6	46,2	8	40,0	
<b>NM</b>	18	47,7	4	30,8	6	30,0	
<i><b>TIMP3</b></i>							
<b>M</b>	21	75,0	6	85,7	10	83,3	0,70
<b>HM</b>	3	10,7	0	0	0	0	
<b>NM</b>	4	14,3	1	14,3	2	16,7	
<i><b>MGMT</b></i>							
<b>M</b>	1	2,6	0	0	0	0	0,37
<b>HM</b>	13	34,2	5	38,5	12	60,0	
<b>NM</b>	24	63,2	8	61,5	8	40,0	

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; M – metilado; HM- Hemimetilado; NM – não metilado ; Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (3 *CDH1*, 27 *TIMP3*, 3 *MGMT*)

Tabela 15- Perfil de metilação dos genes, segundo os três graus de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV.

	NIC I (n=13)		NIC II (n=16)		NIC III (n=44)		Valor p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	6	66,7	9	60,0	24	66,7	0,90
<b>NM</b>	3	33,3	6	40,0	12	33,3	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	11	100	10	90,9	34	94,4	0,62
<b>NM</b>	0	0	1	9,1	2	5,6	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	6	46,2	6	37,5	18	41,9	0,90
<b>NM</b>	7	53,8	10	62,5	25	58,1	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	4	44,4	2	13,3	11	30,6	0,53
<b>HM</b>	2	22,2	7	46,7	13	36,1	
<b>NM</b>	3	33,3	6	40,0	12	33,3	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	11	100,0	8	72,7	31	86,1	0,48
<b>HM</b>	0	0	2	18,2	3	8,3	
<b>NM</b>	0	0	1	9,1	2	5,6	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	0	0	0	0	1	2,3	0,92
<b>HM</b>	6	46,2	6	37,5	17	39,5	
<b>NM</b>	7	53,8	10	62,5	25	58,1	

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; M – metilado; HM- Hemimetilado; NM – não metilado ; Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (13 *CDH1*, 15 *TIMP3*, 1 *MGMT*)

Na tabela 16, mais de 80% das mulheres com NIC I e NIC II, independente da infecção pelo HIV, (44 com NIC I e 25 com NIC II) apresentaram pelo menos um gene metilado, enquanto que em 62 mulheres com NIC III (95,1%) tiveram pelo menos um gene metilado ( $p=0,33$ ). Quando se avalia os grupos separadamente, observa-se que 79,5% das mulheres infectadas pelo HIV e 100% das não infectadas, com NIC I, apresentaram pelo menos um gene metilado. Nas mulheres com NIC II e III o percentual de presença de algum gene metilado foi superior a 80% nos dois grupos, e não houve diferença significativa.

**Tabela 16- Número de genes metilados, segundo os graus de NIC.**

Número de genes metilados	NIC I (n=52)		NIC II (n=30)		NIC III (n=65)		Valor p*
	n	%	n	%	n	%	
<b>INFECTADAS E NÃO INFECTADAS HIV</b>							
<b>0</b>	8	15,4	5	16,7	3	4,6	0,33
<b>1</b>	17	32,7	9	30,0	21	32,3	
<b>2</b>	17	32,7	12	40,0	32	49,2	
<b>3</b>	10	19,2	4	13,3	9	13,8	
<b>INFECTADAS PELO HIV</b>							
	(n=39)		(n=14)		(n=21)		
<b>0</b>	8	20,5	2	14,3	1	4,8	0,48
<b>1</b>	10	25,6	6	42,9	6	28,6	
<b>2</b>	15	38,5	4	28,6	12	57,1	
<b>3</b>	6	15,4	2	14,3	2	9,5	
<b>NÃO INFECTADAS PELO HIV</b>							
	(n=13)		(n=16)		(n=44)		
<b>0</b>	0	0	3	18,8	2	4,5	0,08
<b>1</b>	7	53,8	3	18,8	15	34,1	
<b>2</b>	2	15,4	8	50,0	20	45,5	
<b>3</b>	4	30,8	2	12,5	7	15,9	

\* Teste Qui-quadrado de Pearson;

### **7-2-3 Resultados da análise univariada, dos grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, em relação à recidiva ou não da NIC.**

Como pode ser visto na tabela 17, no grupo de mulheres infectadas pelo HIV, 25 apresentaram recidiva de NIC e 49 não recidivaram. Já no grupo de não infectadas, 8 recidivaram e 65 não.

A chance de mulheres infectadas pelo HIV apresentarem recidiva de NIC foi 4,15 vezes à chance das mulheres não infectadas apresentarem recidiva (IC a 95% = 1,72 – 9,98).

Não houve diferença significativa quanto à idade ( $p= 0,99$ ), tabagismo ( $p=0,50$ ), número de parceiros sexuais ( $p=0,60$ ), paridade ( $p=0,39$ ) e idade de início de atividade sexual ( $p=0,96$ ) em relação à recidiva ou não de NIC.

**Tabela 17- Comparação entre as variáveis sociodemográficas, segundo a recidiva ou não de NIC.**

	Com recidiva (n=33)		Sem recidiva (n=114)		Valor p*	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
<b>Idade</b>							
< 33 anos	15	45,5	52	45,6	0,99	0,99	0,46 – 2,16
≥ 33 anos	18	54,5	62	54,4		1,0	
<b>Tabagismo</b>							
Fumante	14	42,4	41	36,0	0,50	1,31	0,60 – 2,89
Não fumante	19	57,6	73	64,0		1,0	
<b>Nº Parceiros</b>							
≥ 3	10	30,3	48	42,1	0,60	0,77	0,29 – 2,05
< 3	10	30,3	37	32,5		1,0	
<b>Perdas**</b>							
	13	39,4	29	25,4			
<b>Paridade</b>							
≥ 2	12	36,4	51	44,7	0,39	0,71	0,32 – 1,57
< 2	21	63,6	63	55,3		1,0	
<b>Início vida sexual</b>							
< 17 anos	12	36,4	42	36,8	0,96	0,98	0,44 – 2,19
≥ 17 anos	21	63,6	72	63,2		1,0	
<b>HIV</b>							
Infectadas	25	75,8	49	43,0	0,001	4,15	1,72 – 9,98
Não infectadas	8	24,2	65	57,0		1,0	

\*Teste Qui-quadrado *Pearson* ;OR - *dds ratio* ; IC –intervalo de confiança

\*\*Excluídos 42 casos que não informaram o número de parceiros

De acordo com a tabela 18, avaliando os exames realizados anteriormente à CAF não foi observada diferença significativa quanto à citologia oncológica ( $p=0,16$ ), grau da colposcopia ( $p=0,12$ ) e grau de lesão à biópsia (0,44).

Também o grau de lesão na peça da CAF não mostrou diferença significativa ( $p=0,49$ ) em relação às mulheres que apresentaram recidiva ou não de NIC.

No entanto, quando se observa as características histopatológicas do cone cervical, tanto as margens cirúrgicas como a ocupação glandular apresentaram diferença significativa, mostrando que 13 mulheres (39,4%) que recidivaram apresentavam margens cirúrgicas comprometidas, comparadas com as que não recidivaram, onde 18 (15,8%) apresentaram margens comprometidas ( $p= 0,003$ ) e a ocupação glandular estava presente em 12 mulheres (36,4%) com recidiva de lesão ( $p= 0,000$ ).

Já o resultado da PCR para detecção do tipo de HPV, em relação à recidiva ou não de NIC, não foi significativo ( $p=0,45$ ), embora 19 mulheres (57,6%) que tiveram recidiva de lesão apresentavam HPV e destas 17 (51,5%) foram diagnosticadas como portadoras do HPV de alto risco (TAB. 18).

**Tabela 18- Comparação entre os exames propedêuticos, segundo a recidiva ou não de NIC.**

	Com recidiva (n = 33)		Sem recidiva (n = 114)		Valor p	OR	IC a 95%
	n	%	n	%			
<b>Citologia</b>							
Alterada	20	60,6	80	70,2	0,16*	0,56	0,25 – 1,26
Normal	13	39,4	29	25,4		1,0	
Perdas***			5	4,4			
<b>Colposcopia</b>							
Grau II	23	69,7	62	54,4	0,12*	1,92	0,84 – 4,41
Grau I	10	30,3	52	45,6		1,0	
<b>Biópsia</b>							
NIC II / III	16	48,5	64	56,1	0,44*	0,74	0,34 – 1,60
NIC I	17	51,5	50	43,9		1,0	
<b>CAF</b>							
NIC II / III	23	69,7	72	63,2	0,49*	1,34	0,58 – 3,09
NIC I	10	30,3	42	36,8		1,0	
<b>Margens cirúrgicas</b>							
Comprometidas	13	39,4	18	15,8	0,003*	3,53	1,47 – 8,47
Livres	18	54,5	88	77,2			
Perdas****	2	6,1	8	7,0			
<b>Ocupação glandular</b>							
Presente	12	36,4	5	4,4	0,000**	12,46	3,97 – 39,07
Ausente	21	63,6	109	95,6		1,0	
<b>PCR HPV</b>							
Positiva	19	57,6	49	43,0	0,45*	1,36	0,61 – 3,01
Negativa	14	42,4	49	43,0		1,0	
Perdas*****			16	14,0			
<b>Tipo HPV</b>							
Alto risco	17	51,5	35	30,7	0,20**	3,4	0,69 – 16,69
Baixo risco	2	6,1	14	12,3		1,0	
Perdas*****	14	42,4	65	57,0			

\* Teste Qui-quadrado *Pearson*\*; \*Teste *Fisher* ; OR - *dds ratio* ; IC –intervalo de confiança

\*\*\*exclusão de 5 casos de ASC-US;

\*\*\*\* 10 Margens não avaliadas por apresentarem bordos queimados;

\*\*\*\*\*excluídos 16 casos que não tiveram resultado do exame

\*\*\*\*\* excluídos os 79 casos negativos da PCR (Foram pesquisados os tipos 6,11,16,18,31,33,35)

Na tabela 19, quanto à presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*, independente da infecção pelo HIV, foi encontrada diferença significativa para o gene *TIMP3* ( $p=0,04$ ), em relação à recidiva ou não de NIC.

*CDH1* metilado esteve presente em 64,5% das mulheres com recidiva de NIC, sendo que em 45,2% esteve hemimetilado, mas sem diferença significativa ( $p=0,54$ ).

*TIMP3* esteve metilado na grande maioria das pacientes. Nas mulheres com recidiva esteve presente em 77,8% e em 93,1% das mulheres sem recidiva de NIC com diferença significativa entre os grupos ( $p=0,04$ ).

*MGMT* esteve metilado em 51,6% das mulheres com recidiva de NIC e em apenas 40,2% no grupo sem recidiva, sem diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,26$ ). Quando avaliado o perfil de metilação, *MGMT* esteve metilado em 6,5% das mulheres com recidiva e hemimetilado em 45,2% enquanto nas mulheres sem recidiva esteve ausente metilado e presente hemimetilado em 40,2%, com diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,02$ ) (TAB.19).

Tabela 19- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, independente da infecção pelo HIV.

	Com recidiva NIC (n=33)		Sem recidiva NIC (n=114)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	20	64,5	62	62,0	0,80*	1,11	0,48 – 2,58
<b>NM</b>	11	35,5	38	38,0		1,0	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	14	77,8	81	93,1	0,04**	0,26	0,07 – 1,04
<b>NM</b>	4	22,2	6	6,9		1,0	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	16	51,6	45	40,2	0,26*	1,59	0,71 – 3,53
<b>NM</b>	15	48,4	67	59,8		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	6	19,4	27	27,0	0,54*		
<b>HM</b>	14	45,2	35	35,0			
<b>NM</b>	11	35,5	38	38,0			
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	12	66,7	75	86,2	0,10*		
<b>HM</b>	2	11,1	6	6,9			
<b>NM</b>	4	22,2	6	6,9			
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	2	6,5	0	0	0,02*		
<b>HM</b>	14	45,2	45	40,2			
<b>NM</b>	15	48,8	67	59,8			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança  
M – metilado ; HM- hemimetilado; NM – não metilado ;  
Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (16 *CDH1*, 42 *TIMP3*, 4 *MGMT*)

Quando foram avaliados os grupos separadamente, em relação à presença ou não de metilação, nas mulheres infectadas pelo HIV não foi encontrada diferença significativa entre o grupo com recidiva de NIC e sem recidiva (TAB. 20).

*CDH1* metilado esteve presente em 62,5% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva, sendo que em 41,7% estava hemimetilado ( $p=0,90$ );

*TIMP3* metilado esteve presente em 78,6% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva, sendo que em apenas 14,3% estava hemimetilado ( $p=0,22$ ).

*MGMT* esteve presente metilado em 47,8% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva de NIC ( $p=0,62$ ), enquanto que no grupo sem recidiva de NIC, esteve presente apenas hemimetilado em 41,7% ( $p=0,33$ ) (TAB. 20).

Nas mulheres não infectadas pelo HIV também não se observa diferença significativa em relação à presença ou não de metilação dos genes nos dois grupos (TAB. 21).

*CDH1* metilado esteve presente em 71,4% das mulheres com recidiva, também com elevado índice de hemimetilação (57,1%) ( $p=0,46$ ).

*TIMP3* esteve somente metilado em 75% das mulheres não infectadas com recidiva de NIC ( $p=0,16\%$ ).

*MGMT* metilado esteve presente em 12,5% das mulheres com recidiva de NIC e hemimetilado em 50% delas, enquanto esteve somente hemimetilado (39,1%) nas mulheres sem recidiva de NIC, com diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,01$ ) (TAB. 21).

**Tabela 20- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, nas mulheres infectadas pelo HIV.**

	Com recidiva NIC (n=25)		Sem recidiva NIC (n=49)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	15	62,5	28	59,6	0,81*	1,13	0,41 – 3,11
<b>NM</b>	9	37,5	19	40,4		1,0	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	11	78,6	29	87,9	0,41**	0,51	0,10 – 2,63
<b>NM</b>	3	21,4	4	12,1		1,0	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	11	47,8	20	41,7	0,62*	1,28	0,47 – 3,49
<b>NM</b>	12	52,2	28	58,3		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	5	20,8	11	23,4	0,90*		
<b>HM</b>	10	41,7	17	36,2			
<b>NM</b>	9	37,5	19	40,4			
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	9	64,3	28	84,8	0,22*		
<b>HM</b>	2	14,3	1	3,0			
<b>NM</b>	3	21,4	4	12,1			
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	1	4,3	0	0	0,33*		
<b>HM</b>	10	43,5	20	41,7			
<b>NM</b>	12	52,2	28	58,3			

\* Teste Qui-quadrado de *Pearson*; \*\*Teste *Fisher*; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança  
M – metilado ; HM- Hemimetilado; NM – não metilado;  
Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (3 *CDH1*, 27 *TIMP3*, 3 *MGMT*)

**Tabela 21- Perfil de metilação dos genes, segundo a recidiva ou não de NIC, nas mulheres não infectadas pelo HIV.**

	Com recidiva NIC (n=8)		Sem recidiva NIC (n=65)		Valor p	OR	IC 95%
	n	%	n	%			
<b>Grupos M/HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M/HM</b>	5	71,4	34	64,2	1,0**	1,40	0,25 – 7,91
<b>NM</b>	2	28,6	19	35,8		1,0	
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M/HM</b>	3	75,0	47	95,9	0,21**	0,13	0,01 – 1,84
<b>NM</b>	1	25,0	2	4,1		1,0	
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M/HM</b>	5	62,5	25	39,1	0,27	2,6	0,57 - 11,8
<b>NM</b>	3	37,5	39	60,9		1,0	
<b>Grupos M X HM X NM</b>							
<b><i>CDH1</i></b>							
<b>M</b>	1	14,3	16	30,2	0,46*		
<b>HM</b>	4	57,1	18	34,0			
<b>NM</b>	2	28,6	19	35,8			
<b><i>TIMP3</i></b>							
<b>M</b>	3	75,0	47	87,0	0,16*		
<b>HM</b>	0	0	5	9,3			
<b>NM</b>	1	25,0	2	3,7			
<b><i>MGMT</i></b>							
<b>M</b>	1	12,5	0	0	0,01*		
<b>HM</b>	4	50,0	25	39,1			
<b>NM</b>	3	37,5	39	60,9			

\*Teste Qui-quadrado *Pearson*; \*\*Teste Fisher ; OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança

M – metilado; HM- Hemimetilado; NM – não metilado ;

Excluídos casos que não foram detectadas amplificação (13 *CDH1*, 15 *TIMP3*, 1 *MGMT*)

Na tabela 22, 29 mulheres (87,9%) com recidiva de NIC e 102 mulheres (89,5%) sem recidiva, independentes da infecção pelo HIV, apresentaram pelo menos um dos genes, *CDH1*, *MGMT*, *TIMP3*, metilados ( $p=0,31$ ). Também não houve diferença significativa quando foram comparados os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV separadamente, embora em 4% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva os três genes foram detectados metilados e este índice foi 3 vezes maior (12,5%) nas mulheres não infectadas pelo HIV.

**Tabela 22- Número de genes metilados, segundo a recidiva de NIC.**

Número de genes metilados	Com recidiva NIC (n=33)		Sem recidiva NIC (n=114)		Valor p*
	n	%	n	%	
<b>INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV</b>					
<b>0</b>	4	12,1	12	10,5	0,31
<b>1</b>	10	30,3	37	32,5	
<b>2</b>	17	51,5	44	38,6	
<b>3</b>	2	6,1	21	18,4	
<b>INFECTADAS PELO HIV</b>					
	(n=25)		(n= 49)		
<b>0</b>	3	12,0	8	16,3	0,29
<b>1</b>	8	32,0	14	28,6	
<b>2</b>	13	52,0	18	36,7	
<b>3</b>	1	4,0	9	18,4	
<b>NÃO INFECTADAS PELO HIV</b>					
	(n=8)		(n= 65)		
<b>0</b>	1	12,5	4	6,2	0,81
<b>1</b>	2	25,0	23	35,4	
<b>2</b>	4	50,0	26	40,0	
<b>3</b>	1	12,5	12	18,5	

\*Qui-quadrado *Pearson*

O índice de metilação no grupo das mulheres com recidiva de NIC e também no grupo das sem recidiva foi de 0,66 (mediana de dois genes metilados por cada caso e controle).

#### 7-3-4 Análise multivariada

Foi realizada análise multivariada (TAB. 23) por regressão logística, incluindo todas as variáveis que tiveram valor  $p < 0,25$ . Foram incluídos os genes *CDH1* e *MGMT*, por serem as variáveis diretamente relacionadas aos objetivos desta pesquisa, apesar de terem apresentado valor  $p > 0,25$  na análise univariada (TAB. 19).

As variáveis, citologia e tipagem do HPV, e gene *TIMP3* (APENDICE D) não foram incluídas no modelo, apesar do valor  $p < 0,25$ , por levarem a uma redução importante do número de casos e controles (perda de 84 e 65 casos respectivamente). A variável colposcopia foi retirada do modelo de regressão pela sua interação com a variável citologia ( $p = 0,03$ ) (APENDICE C).

**Tabela 23- Modelo inicial da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC.**

Variável	Valor p	OR	IC 95%
Infecção HIV	0,09	2,48	0,87 – 7,06
Margens cirúrgicas	0,10	2,49	0,83 – 7,47
Ocupação glandular	0,001	11,57	2,90 – 46,18
<i>CDH1</i>	0,64	0,78	0,28 – 2,18
<i>MGMT</i>	0,97	1,02	0,37 – 2,85

OR - odds ratio ; IC – intervalo de confiança

As variáveis sem significância estatística ( $p > 0,05$ ) foram retiradas do modelo inicial e do subsequente na seguinte ordem: *MGMT* e *CDH1*. O modelo final contou com três variáveis com significância independentes (TAB. 24).

**Tabela 24- Modelo final da análise multivariada, segundo a recidiva ou não de NIC.**

Variável	Valor p	OR	IC 95%
<b>Ocupação glandular</b>	0,000	11,60	2,93 – 45,89
<b>HIV</b>	0,09	2,47	0,87 – 7,05
<b>Margem comprometida</b>	0,09	2,50	0,87 – 7,27

Teste *Hosmer e Lemeshow* ( $p = 0,94$ ); OR - *odds ratio* ; IC –intervalo de confiança

## 8 DISCUSSÃO

A discussão será feita de acordo com a sequência de apresentação dos resultados.

### 8-1 Discussão dos resultados das análises dos grupos de mulheres infectadas ou não pelo HIV

Comparando os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, não houve diferença significativa quanto à idade e tabagismo, em relação ao risco de NIC, estando de acordo com alguns trabalhos (Flatley *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Ceccato Junior *et al.*, 2016), embora Mzarico *et al.*(2015) estudando 1007 mulheres não infectadas pelo HIV, observou que a chance dessas mulheres, tabagistas (média de 7 cigarros/dia), desenvolverem NIC foi 1,64 vezes a chance das não tabagistas (IC 95%= 1,33-1,88;  $p < 0,05$ ). Massad *et al.* (2015) em estudo de coorte multicêntrico incluindo 3465 mulheres, 900 não infectadas pelo HIV e 2565 infectadas, encontraram diferença significativa entre os grupos, em relação à idade ( $p < 0,0001$ ) e tabagismo ( $p = 0,01$ ). No estudo de Teixeira *et al.*(2012) onde foram avaliadas 494 mulheres infectadas pelo HIV, as mulheres jovens (<34 anos) apresentaram maior chance de NIC (OR 1,5: IC 95%=1,0-2,4) e não encontraram relação com o tabagismo. Em nosso estudo o tabagismo foi levado em consideração apenas se a paciente era ou não fumante no momento da consulta.

Também não houve diferença significativa quanto à paridade, com uma mediana de dois partos e idade de início de vida sexual, mediana de 17 anos, estando de acordo com alguns trabalhos (Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011), embora Ceccato Junior *et al.* (2016) tenham relatado um maior número de partos ( $P = 0,0001$ ) e início de atividade sexual mais precoce ( $p = 0,02$ ) em mulheres infectadas pelo HIV. No estudo de Pinto *et al.* (2011) onde os autores avaliaram 631 mulheres infectadas pelo HIV, foi observado que 32% iniciaram vida sexual antes dos 16 anos, sendo indicado como fator de risco para NIC.

Quanto ao número de parceiros, 44,6% das mulheres infectadas pelo HIV e 34,2% das não infectadas tiveram mais de 3 parceiros sexuais, sendo significante a

diferença entre os grupos ( $p=0,03$ ), estando de acordo com alguns trabalhos da literatura (Lodi *et al.*, 2011; Massad *et al.*, 2015; Ceccato Junior *et al.*, 2016), embora no estudo de Lima *et al.*, (2009), onde foram estudadas 94 mulheres infectadas pelo HIV e 107 não infectadas, o número de parceiros sexuais não tenha sido significativo. Pinto *et al.* (2011) avaliando somente mulheres infectadas pelo HIV, observaram que 61% ( $n=631$ ) delas tiveram no máximo 5 parceiros sexuais.

Em 33,8% das mulheres infectadas pelo HIV e 23,3% das não infectadas o resultado da citologia oncótica foi normal, indicando um elevado índice de falso negativo do exame, visto que todas as pacientes incluídas neste estudo apresentavam algum grau de NIC na biópsia e na CAF. Estudos demonstram uma baixa sensibilidade da citologia oncótica na detecção de lesões cervicais (Schiffman *et al.*, 2007), sendo no máximo de 55,2% para diagnóstico de NIC II e 57,1% para NIC III (Arbyn *et al.*, 2008; Arbyn *et al.*, 2010).

A colposcopia mostrou resultados condizentes com os da biópsia. Também se observa que 74,3% das mulheres infectadas pelo HIV apresentavam NIC I. No período em que estas mulheres foram submetidas à CAF, a cirurgia estava indicada para mulheres infectadas pelo HIV com NIC I, devido ao maior risco destas mulheres apresentarem progressão da doença (Fruchter *et al.*, 1996; Levi *et al.*, 2002; Levi *et al.*, 2004; Nappi *et al.*, 2005; Massad *et al.*, 2007). Como de fato, quando realizada a CAF houve um agravamento das lesões nas infectadas pelo HIV, com os resultados da biópsia subestimando o grau da lesão. Alguns trabalhos mostram um risco de NIC de alto grau maior nas mulheres infectadas pelo HIV quando comparadas às não infectadas (Denslow *et al.*, 2014; Massad *et al.*, 2015).

Avaliando as características histopatológicas da peça cirúrgica, não houve diferença significativa entre os grupos, sendo que mais de 70% apresentaram margens livres e mais de 60% ausência de ocupação glandular estando de acordo com os achados de Foulot *et al.*(2008). Foram excluídos 10 casos que apresentaram bordos queimados impossibilitando a avaliação adequada das margens cirúrgicas. Van Bogaert (2014) estudando 83 mulheres infectadas pelo HIV e 143 não infectadas, com NIC II e III submetidas à CAF, verificaram margens livres na peça cirúrgica em

34,9% e comprometidas em 65,1%, sendo que destas 43,9% eram infectadas pelo HIV e 56,1% não infectadas ( $p=0,88$ ).

Quando foi realizada a PCR para identificação do tipo de HPV, se de alto ou baixo risco, também não foi constatada diferença significativa entre os grupos, embora o HPV estivesse mais presente nas mulheres infectadas pelo HIV (52,7%) em relação às não infectadas (39,7%) estando de acordo com a literatura, onde os estudos mostram uma maior prevalência da infecção pelo HPV nas mulheres infectadas pelo HIV, com índices variando de 34 a 98% (Ellerbrock *et al.*, 2000; Levi *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2011; Veldhuijzen *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Ceccato Junior *et al.*, 2016). O HPV de alto risco esteve presente em mais de 70% das mulheres, em ambos os grupos, o que se confirma na literatura (Widschwendter, Gattringer, *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011; Spinillo *et al.*, 2014; Ceccato Junior *et al.*, 2016). Já está bem documentado na literatura, que tanto a infecção pelo HPV de alto risco (De Vuyst *et al.*, 2012) como NIC (Chung *et al.*, 2013) em mulheres infectadas pelo HIV são mais frequentes quando comparadas às não infectadas (Bierkens *et al.*, 2013).

A presença de genes não metilados em amostras de tumores primários pode ser decorrente da presença de tecido normal, assim como uma possível heterogeneidade dentro da amostra do tumor para alteração epigenética (Bachman *et al.*, 1999) o que justificaria a presença dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3* não metilados nestas amostras.

Não houve diferença significativa, entre os grupos de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, quanto à presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT*. Poucos estudos na literatura avaliam biomarcadores do câncer cervical em mulheres infectadas pelo HIV (Nye *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2014). De Vuyst *et al.* (2015) e Bierkens *et al.* (2013) estudando mulheres co-infectadas pelo HIV e HPV, avaliaram a presença dos genes *CADM1*, *MAL* e *MIR124-2* em esfregaços cervicais e encontraram uma frequência maior destes genes metilados em mulheres com NIC II e NIC III em relação às mulheres sem NIC. Também observaram uma menor frequência desses genes em mulheres com NIC III quando comparadas com mulheres com NIC II, demonstrando que genes marcadores de

metilação na carcinogênese cervical são métodos promissores de triagem nessas mulheres.

## **8-2 Discussão dos resultados das análises de metilação dos genes segundo o grau de NIC**

Quanto à presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*, de acordo com o grau de lesão encontrada na CAF, não houve diferença significativa quando comparamos o grupo de mulheres com NIC II/III em relação ao grupo com NIC I, independente da infecção pelo HIV.

Avaliando os grupos separadamente, também não foi encontrada diferença significativa. No entanto nas mulheres infectadas pelo HIV, *CDH1* esteve presente 69,7%, *TIMP3* em 84,2% e *MGMT* em 51,5% metilados no grupo com NIC II/III. Nas mulheres não infectadas com NIC II/III, *CDH1* metilado esteve presente em 64,7%, estando de acordo com o estudo de Flatley *et al.*(2009) onde os autores observaram maior frequência de *CDH1* em mulheres com NIC II/III quando comparadas com mulheres com NIC I (p= 0,007).

Também nas mulheres não infectadas pelo HIV, *TIMP3* metilado esteve presente em 93,6% (83,0% de metilados na NIC II/III e em 100% dos casos na NIC I). *MGMT* metilado esteve presente em 40,7% na NIC II/III, não tendo diferença significativa quando comparado com o grupo com NIC I. Nos trabalhos de Virmani *et al.*, (2001) e Sun *et al.*(2012), os autores encontraram uma diferença significativa em relação à presença de *MGMT* quando compararam NIC II/III com NIC I, mostrando ser um bom biomarcador para lesões pré invasoras.

Quando se compara a presença ou não de metilação dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* com os três graus de NIC separadamente, independente da infecção pelo HIV, também não houve diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma avaliando somente as mulheres infectadas pelo HIV, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

Em revisão sistemática da literatura, incluindo 51 estudos, com mulheres não infectadas pelo HIV, (14% com material parafinado), verificou-se que os genes metilados mais prevalentes no câncer cervical foram *CDH1* (58%), *MGMT* e *RASSF1A* (< 20%). Analisando os diversos estudos, *CDH1* apresentou uma ampla variação na frequência, tanto em tecido normal como nas lesões invasivas. Um pré requisito importante para um biomarcador é a segurança de seu resultado e isso foi encontrado em 60% dos estudos com *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*. Outro pré requisito é sua sensibilidade com bom VPP, o que não foi encontrado com nenhum marcador sozinho (Wentzensen *et al.*, 2009).

Nas mulheres não infectadas pelo HIV, o gene *CDH1* esteve metilado em 66,7% na NIC I, 60,0% na NIC II e 66,7% na NIC III ( $p=0,90$ ). A literatura mostra uma frequência de metilação de *CDH1* superior a 80% no câncer invasor, variando de 26 a 39% na NIC II/III, 23% na NIC I e ausência em tecidos normais, sendo considerado um candidato a biomarcador de detecção precoce do câncer cervical (Widschwendter, Gattringer, *et al.*, 2004; Widschwendter, Ivarsson, *et al.*, 2004; Shivapurkar *et al.*, 2007; Terra *et al.*, 2007; Flatley *et al.*, 2009). No trabalho de Narayan *et al.* (2003) os autores encontraram *CDH1* metilado presente em 51,1% no câncer cervical e somente 6,7% na NIC demonstrando maior redução da metilação desse gene no câncer invasor, sugerindo então que sua inativação seja um evento mais tardio. Estudos mostram *CDH1* mais frequente nos carcinomas de células escamosas em relação aos adenocarcinomas (Narayan *et al.*, 2003; Cavallaro e Christofori, 2004; Branca *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Shivapurkar *et al.*, 2007).

Também, nas mulheres não infectadas pelo HIV, o gene *TIMP3* metilado esteve presente em 100% com NIC I, 90,9% com NIC II e 94,4% com NIC III, não mostrando diferença significativa ( $p= 0,62$ ). Widschwendter, Gattringer, *et al.* (2004) encontraram uma frequência de metilação de *TIMP3*, ausente em NIC I, 16% em NIC II/III e 100% no câncer invasor, com significativa diferença entre os grupos ( $p=0,001$ ) enquanto Narayan *et al.* (2003) encontraram uma frequência de 1,1% no câncer de células escamosas. Alguns trabalhos na literatura mostram que a presença do gene *TIMP3* metilado é mais prevalente nos adenocarcinomas quando comparados aos carcinomas de células escamosas (Narayan *et al.*, 2003; Jeong *et*

*al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Wisman *et al.*, 2006; Henken *et al.*, 2007; Wentzensen *et al.*, 2009).

O gene *MGMT* nas mulheres não infectadas pelo HIV, esteve metilado em 46,2% na NIC I, 37,5% na NIC II e 41,9% na NIC III ( $p=0,90$ ). Banzai *et al.* (2014) relatam *MGMT* metilado presente em 20,8% de mulheres sem NIC, 27,3% com NIC III e 34% com câncer invasor não encontrando diferença significativa entre os grupos ( $p=0,76$ ). Outros estudos mostram que a frequência de hipermetilação de *MGMT* na NIC e no câncer cervical varia de 5 a 92%. (Virmani *et al.*, 2001; Narayan *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Zambrano *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006; Henken *et al.*, 2007; Jacinto e Esteller, 2007; Shivapurkar *et al.*, 2007; Wentzensen *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Spathis *et al.*, 2011). Alguns trabalhos mostram um aumento na frequência do gene *MGMT* metilado à medida que ocorre agravamento do grau de NIC (Virmani *et al.*, 2001; Widschwendter, Gattringer, *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Iliopoulos *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Segundo alguns autores, *MGMT* metilado é mais frequente em carcinomas de células escamosas quando comparados aos adenocarcinomas (Dong *et al.*, 2001; Henken *et al.*, 2007).

### **8-3 Discussão dos resultados das análises dos grupos em relação à ocorrência ou não de recidiva de NIC**

Considera-se doença residual aquela identificada durante o primeiro ano após a CAF, ao passo que é considerada recidiva quando acontece após o segundo ano (Paraskevaïdis *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 2001; Milojkovic, 2002; Van Hamont *et al.*, 2006; Kitchener *et al.*, 2008; Prato *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2012). Neste estudo foi considerado recidiva de lesão o aparecimento ou a persistência de NIC identificada por biópsia, independente do tempo decorrente da primeira conização.

Observou-se que a chance das mulheres infectadas pelo HIV apresentarem recidiva de NIC foi 4,15 vezes a chance das pacientes não infectadas recidivarem (IC 95% = 1,72 – 9,98). Russomano *et al.*(2013) avaliando 60 mulheres infectadas pelo HIV e 209 não infectadas, encontraram um risco de recidiva de NIC 4,21 vezes maior nas infectadas (IC 95% = 1,42-12,43), corroborando com nosso estudo e também com outros autores (Heard *et al.*, 2005; Nappi *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Lima *et al.*,

2009; Cejtin *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2011). A literatura mostra taxas de recidiva de NIC, variando de 25 a 55% em mulheres infectadas pelo HIV (Massad *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Malapati *et al.*, 2011) e 5 a 21%, em mulheres não infectadas (Terra *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2012; Katki *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2014).

Neste estudo todas as mulheres infectadas pelo HIV estavam em uso de terapia antiretroviral (HAART) no momento do diagnóstico da NIC e da realização da CAF. Ainda é controverso o impacto da HAART no desenvolvimento de NIC e recidiva (Zeier *et al.*, 2012; Blitz *et al.*, 2013; Patrelli *et al.*, 2013). Huchko *et al.*(2014) avaliando 283 mulheres infectadas pelo HIV com NIC, não encontraram diferença significativa quanto ao uso de HAART e recidiva de lesão (OR = 2,25 – IC 95%: 0,7–12,0).

A idade ( $p=0,99$ ), o tabagismo ( $p=0,50$ ), o número de parceiros sexuais ( $p=0,60$ ), a paridade ( $p=0,39$ ) e idade de início de atividade sexual ( $p=0,96$ ) não foram significantes para recidiva de NIC, estando de acordo com alguns estudos (Alonso *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Kodampur *et al.*, 2013; Russomano *et al.*, 2013), embora em outros trabalhos, a idade tenha sido relatada como fator de risco (Flannelly *et al.*, 2001; Paraskevoidis *et al.*, 2003; Manchanda *et al.*, 2008; Serati *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2015). Fu *et al.*, (2015) e Herfs *et al.*(2015) avaliando mulheres submetidas à CAF por NIC não encontraram diferença significativa entre os grupos com e sem recidiva, quanto à idade ( $p=0,59$ ) e tabagismo ( $p=0,78$ ). Serati *et al.*(2012) encontraram taxa de recidiva de NIC de 22,7% e não observaram diferença significativa em relação ao tabagismo ( $p=0,30$ ) e idade de início de atividade sexual ( $p=0,27$ ).

A citologia oncológica ( $p=0,16$ ), a colposcopia ( $p=0,12$ ), o grau de lesão à biópsia ( $p=0,44$ ) assim como o grau de lesão na peça da CAF ( $p=0,49$ ), também não foram significantes, embora a maioria das mulheres que apresentaram recidiva tivesse citologias alteradas no encaminhamento, colposcopia grau II e NIC II/III no anatomopatológico da CAF estando de acordo com alguns trabalhos (Heard *et al.*, 2005; Malapati *et al.*, 2011; Russomano *et al.*, 2013). Kodampur *et al.*(2013) demonstraram significativo VPP da citologia oncológica antes da CAF ( $p=0,043$ ) e Del

Mistro *et al.*(2015) encontraram um risco maior de recidiva de NIC em mulheres com NIC III (OR 6,02; IC 95%= 1,73 – 20,9) estando de acordo com outros trabalhos que mostram chance de recidiva de NIC, variando de 1 a 21%, em mulheres tratadas por NIC III (Chan *et al.*, 2009; Melnikow *et al.*, 2009).

Avaliando as características histopatológicas do cone, observou-se que quando havia comprometimento das margens cirúrgicas e ocupação glandular, as taxas de recidiva de NIC foram mais altas o que já se encontra bem estabelecido na literatura (Maluf *et al.*, 2004; Nagi e Schlosshauer, 2006; Alonso *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2007; Ghaem-Maghami *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2007; Terra *et al.*, 2007; Tyler *et al.*, 2007; Manchanda *et al.*, 2008; Prato *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009; Baloglu *et al.*, 2010; Cejtin *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2011; Serati *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2014; Del Mistro *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2015; Van Bogaert, 2015; Wu *et al.*, 2015), embora outros trabalhos não tenham encontrado significância em relação ao comprometimento ou não de margem cirúrgica e recidiva (Oliveira *et al.*, 2012; Russomano *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2015; Herfs *et al.*, 2015). Kodampur *et al.*(2013) relataram que mulheres submetidas à CAF por NIC, com margens livres e presença de ocupação glandular no cone, apresentaram chance de recidiva de lesão 2,67 vezes a chance de mulheres sem ocupação glandular recidivarem (IC 95% = 1,27-5,64).

O HPV não foi significativo como fator de risco para recidiva de NIC ( $p= 0,45$ ) embora 51,5% das mulheres com recidiva de NIC tinham HPV de alto risco. Foram pesquisados os tipos 6,11 de baixo risco e 16,18,31,33 e 35 de alto risco considerados os mais prevalentes de acordo com a literatura (Gök *et al.*, 2007; Thomison *et al.*, 2008; Serati *et al.*, 2012). Estudos demonstram a infecção pelo HPV, principalmente HPV 16, significativo fator de risco para recidiva de NIC (Du *et al.*, 2013; Herfs *et al.*, 2015). Outros trabalhos também apontam a infecção pelo HPV de alto risco como fator de risco para recidiva de NIC (Nappi *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2006; Verguts *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2007; Terra *et al.*, 2007; Baloglu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; De Vuyst *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2014; Del Mistro *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).

O gene *CDH1* metilado esteve presente em 64,5% independente do *status* da infecção pelo HIV, nas mulheres com recidiva de NIC, não mostrando diferença significativa quando comparadas às mulheres sem recidiva. Quando foram avaliados os grupos de infectadas e não infectadas pelo HIV separadamente, houve uma maior frequência de *CDH1* metilado (62,5%) nas infectadas pelo HIV com recidiva de NIC enquanto que nas não infectadas com recidiva ele esteve presente em 71,4%, embora não tenha mostrado também diferença significativa quando comparadas às mulheres sem recidiva de NIC nos dois grupos. Alguns estudos avaliando mulheres não infectadas pelo HIV relatam que aberrante metilação em *CDH1* pode indicar um risco aumentado para recidiva de doença (Widschwendter, Gattringer, *et al.*, 2004; Widschwendter, Ivarsson, *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006; Terra *et al.*, 2007).

A presença do gene *TIMP3* metilado foi de 77,8% nas mulheres com recidiva de NIC e 93,1% nas sem recidiva, independente da infecção pelo HIV, com diferença significativa ( $p=0,04$ ). Quando foram avaliados os grupos separadamente, o gene *TIMP3* metilado esteve presente em 78,6% nas mulheres infectadas pelo HIV com recidiva de NIC e em 87,9% delas sem recidiva sem diferença significativa entre os grupos ( $p=0,41$ ), enquanto que nas mulheres não infectadas esteve presente em 75,0% com recidiva de NIC e em 95,9% sem recidiva, também sem diferença significativa entre os grupos ( $p=0,21$ ). No estudo de Terra *et al.* (2007) não foi observada a presença do gene *TIMP3* metilado nas mulheres com recidiva de NIC e uma frequência apenas de 6,1% nas mulheres sem recidiva de lesão.

O gene *MGMT* metilado esteve presente em 51,6% das mulheres com recidiva de NIC e 40,2% sem recidiva, não mostrando diferença significativa entre os grupos ( $p=0,26$ ), independente da infecção pelo HIV. No entanto quando se avalia os grupos separadamente, infectadas ou não pelo HIV, o gene *MGMT* metilado esteve presente em 47,8% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva de lesão e em 62,5% das não infectadas com recidiva de NIC. Quando foi avaliado seu perfil de metilação, segundo a recidiva ou não de NIC, nas mulheres não infectadas, sua frequência foi de 12,5% metilado e 50,0% de hemimetilados nas mulheres com recidiva e apenas 39,1% de hemimetilados nas mulheres sem recidiva, com diferença significativa entre os grupos ( $p=0,01$ ). Terra *et al.*(2007) encontraram uma

frequência de 39,4% de *MGMT* metilado em mulheres com NIC III, sendo que este gene esteve presente em 71,4% das mulheres com recidiva de NIC.

Estudos indicam menor taxa de recidiva de NIC II quando comparado com NIC III e que diferenças em seus fatores de risco demonstram que NIC III se comporta mais como câncer do que NIC II, sugerindo que biomarcadores para recidiva de NIC II devem ser parcialmente diferentes dos biomarcadores para recidiva de NIC III (Luhn *et al.*, 2013; Del Mistro *et al.*, 2015).

As mulheres com recidiva de NIC, infectadas ou não pelo HIV, apresentaram em 87,9% pelo menos um gene metilado enquanto que em 12,1% delas não foi detectada metilação de nenhum dos genes estudados. Quando foram analisados os grupos separadamente, em 4% das mulheres infectadas pelo HIV com recidiva os três genes estavam metilados enquanto este percentual foi de 12,5% nas não infectadas com recidiva de NIC, embora não tenha sido demonstrada diferença significativa. Terra *et al.* (2007) estudando os genes metilados *RARβ*, *MGMT*, *p16*, *GSTP1*, *DAPk*, *CDH1*, *p14* e *TIMP3* em mulheres com recidiva ou não de NIC, observaram que no grupo que recidivou, as mulheres apresentaram de 3 a 4 genes metilados sendo significativa a diferença ( $p=0,0039$ ), demonstrando que a metilação é mais frequente nestas mulheres.

Foi feita pesquisa na literatura médica, nas bases de dados como *PubMed*, *LILACS*, *BIREME*, *Capes*, *MedLine*, *Cohrane* e *SciELO* e não foram encontrados outros trabalhos em relação a metilação de DNA dos genes estudados, em mulheres infectadas pelo HIV com NIC e em mulheres com recidiva de NIC.

Após análise multivariada por regressão logística, as variáveis importantes para recidiva, encontradas em nosso estudo, foram: ocupação glandular com OR 11,6, infecção pelo HIV com OR de 2,47 e margem comprometida com OR 2,50 estando de acordo com outros trabalhos (Lima *et al.*, 2009; Lodi *et al.*, 2011; Malapati *et al.*, 2011; Lubrano *et al.*, 2012; Kodampur *et al.*, 2013; Russomano *et al.*, 2013; Van Bogaert, 2014; Huchko *et al.*, 2015).

#### 8-4 Comentários finais

Toda paciente que tenha sido submetida à CAF para tratamento de NIC, deve ser acompanhada no pós tratamento, devido à possibilidade de recidiva de NIC. As que apresentarem margens cirúrgicas comprometidas e ou ocupação glandular no cone e as infectadas pelo HIV devem ser seguidas com maior atenção devido à maior chance de recidiva.

Não foi encontrada diferença significativa em relação à presença de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* quando comparados os grupos de infectadas ou não pelo HIV e quando comparados os graus de NIC e recidiva ou não de lesão. Isso pode estar relacionado ao fato que a maioria das mulheres infectadas pelo HIV tinha NIC I na CAF, enquanto a maioria das não infectadas tinha NIC II/III.

Uma limitação de nosso estudo foi não ter sido feita a detecção do DNA HPV de alto risco em todas as peças cirúrgicas, por ser um importante fator de risco na carcinogênese.

Outro fator limitante foi a perda de casos e controles por não detecção dos genes, que pode ter sido decorrente das amostras serem parafinadas e estarem estocadas há mais de 15 anos o que leva a uma maior dificuldade na extração e qualidade do DNA extraído. Acreditamos que essa perda possa ter influenciado no resultado da análise multivariada, onde as variáveis, infecção pelo HIV e margens comprometidas na CAF, apresentaram valor  $p= 0,09$ . Por isso resolvemos mantê-las no modelo final.

Alterações epigenéticas, como metilação de DNA, ocorrem nos diversos estágios de NIC e no câncer cervical invasor. Genes supressores de tumor hipermetilados podem ser utilizados como biomarcadores para detecção precoce de lesões precursoras do câncer. No entanto, poucos são os trabalhos encontrados na literatura, em relação à metilação de genes supressores de tumor, em mulheres infectadas pelo HIV e mulheres com recidiva de NIC, o que mostra a necessidade de mais estudos nessas duas populações. Foi observada uma grande diversidade em relação aos genes estudados, em relação ao grau de lesão, assim como nos

resultados encontrados nos diversos artigos publicados na literatura até o momento (QUA. 4).

**Quadro 4- Estudos metilação de DNA em NIC, HIV e câncer cervical**

Autor	n	Genes avaliados	Grau lesão	HIV
(Virmani <i>et al.</i> , 2001)	17 19	<i>RARβ</i> , <i>GSTP1</i> , <i>p16</i> , <i>MGMT</i> , <i>FHIT</i> , <i>hMLH1</i>	NIC Câncer	NI HIV
(Dong <i>et al.</i> , 2001)	53	<i>p16</i> , <i>APC</i> , <i>HIC1</i> , <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> , <i>CDH1</i>	Câncer	NI HIV
(Widschwendter, Gattringer, <i>et al.</i> , 2004)	23 11	<i>CDH13</i> , <i>CDH1</i> , <i>HSPA2</i> , <i>MLH1</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>TIMP3</i> , <i>DAPK</i> , <i>SOCS1e2</i> e <i>outros</i>	NIC câncer	NI HIV
(Feng <i>et al.</i> , 2005)	85 92	<i>HIC1</i> , <i>MGMT</i> , <i>CDH1</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>RARβ</i> e <i>outros</i>	NIC Câncer	NI HIV
(Lin <i>et al.</i> , 2005)	20 77	<i>p16</i> , <i>MGMT</i>	Cancer NIC	NI HIV
(Kang <i>et al.</i> , 2006)	92	<i>p16</i> , <i>RARβ</i> , <i>TIMP3</i> , <i>CDH1</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>DAPK</i> , <i>APC</i>	Câncer	NI HIV
(Narayan <i>et al.</i> , 2003) (Henken <i>et al.</i> , 2007)	90 24	<i>MGMT</i> , <i>CDH1</i> , <i>DAPK</i> , <i>RARβ</i> , <i>TIMP3</i> , <i>FHIT</i> , <i>RASSF1A</i> e <i>outros</i>	Câncer	NI HIV
(Terra <i>et al.</i> , 2007)	33	<i>p16</i> , <i>RARβ</i> , <i>MGMT</i> , <i>TIMP3</i> , <i>DAPK</i> <i>p14</i> , <i>GSTP1</i> , <i>CDH1</i> ,	NIC	NI HIV

(Shivapurkar <i>et al.</i> , 2007)	45	<i>CDH1, HS3ST2</i>	Câncer	NI HIV
(Flatley <i>et al.</i> , 2009)	200 58 50	<i>DAPK, GSTP1, CDH1, RARβ, MGMT, hMLH1, HIC1</i>	NIC, sem NIC, Câncer	NI HIV
(Wentzensen <i>et al.</i> , 2009)	RS	<i>CDH1, FHIT, TERT, CDH13, MGMT, TIMP3, HIC1 e outros</i>	NIC	NI HIV
(Iliopoulos <i>et al.</i> , 2009)	115	<i>hTERT, DAPK, MGMT</i>	Citologias alteradas	NI HIV
(Kim <i>et al.</i> , 2010)	69 67 32 41	<i>CDH1, DAPK, GSTP1, HIC-1, HIN-1, hMLH1, MGMT, RARβ, p16, RASSF1A, e outros</i>	Citologias câncer HSIL LSIL Normal	NI HIV
(Spathis <i>et al.</i> , 2011)	340	<i>MGMT, hMLH1, p16,</i>	Citologias alteradas e NIC	NI HIV
(Sun <i>et al.</i> , 2012)	667	<i>DAPK1, RARβ, MGMT</i>	Citologia normal e alterada	NI HIV
(Bierkens <i>et al.</i> , 2013)	267	<i>CADM1, MAL</i>	NIC	I HIV
(Banzai <i>et al.</i> , 2014)	22 53	<i>DAPK1, FHIT, MGMT, CDKN2A</i>	NIC Câncer	NI HIV
(De Vuyst <i>et al.</i> , 2015)	251	<i>CADM1, MAL, MIR124-2</i>	NIC e sem NIC	I HIV
Lodi 2016	147	<i>MGMT, TIMP3, CDH1</i>	NIC	I e NI HIV

n número pacientes no estudo; I infectadas; NI não infectadas ; RS revisão sistemática

## 9 CONCLUSÕES

- O perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* não foram fatores preditores para recidiva de NIC
- O perfil de metilação dos genes *CDH1*, *TIMP3* e *MGMT* não esteve relacionado com o grau de NIC
- A infecção pelo HIV não alterou o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *MGMT* e *TIMP3*
- Mulheres infectadas pelo HIV e mulheres submetidas à CAF por NIC, que apresentam ocupação glandular e margens comprometidas no cone, têm risco significativamente mais alto de recidiva de NIC.

## REFERÊNCIAS

AHONEN, M.; BAKER, A. H.; KÄHÄRI, V. M. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. **Cancer Res**, v. 58, n. 11, p. 2310-5, Jun 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622064> >.

AHUJA, N. et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 23, p. 5489-94, Dec 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9850084> >.

AIROLA, K. et al. Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle, and cancer progression. **J Histochem Cytochem**, v. 46, n. 4, p. 437-47, Apr 1998. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9524189> >.

ALONSO, I. et al. Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. **Gynecol Oncol**, v. 103, n. 2, p. 631-6, Nov 2006. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16780934> >.

\_\_\_\_\_. High-risk cervical epithelial neoplasia grade 1 treated by loop electrosurgical excision: follow-up and value of HPV testing. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, n. 4, p. 359.e1-6, Oct 2007. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714678> >.

ANAND-APTE, B. et al. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, n. 5, p. 817-23, Apr 1997. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112976> >.

ARAÚJO, A. C. et al. Incidence of cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of HIV-infected women. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 117, n. 3, p. 211-6, Jun 2012. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445392> >.

ARBYN, M. et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition--summary document. **Ann Oncol**, v. 21, n. 3, p. 448-58, Mar 2010. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176693> >.

\_\_\_\_\_. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. **Obstet Gynecol**, v. 111, n. 1, p. 167-77, Jan 2008. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165406> >.

\_\_\_\_\_. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F88-99, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199969> >.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 2, p. 241-57, Feb 2002. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915942> >.

BACHMAN, K. E. et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. **Cancer Res**, v. 59, n. 4, p. 798-802, Feb 1999. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029065> >.

BAE, J. H. et al. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, n. 6, p. 1271-7, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 1048-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442018> >.

BALOGLU, A. et al. Residual and recurrent disease rates following LEEP treatment in high-grade cervical intraepithelial lesions. **Arch Gynecol Obstet**, v. 282, n. 1, p. 69-73, Jul 2010. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19940997> >.

BANZAI, C. et al. Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. **Int J Clin Oncol**, v. 19, n. 1, p. 127-32, Feb 2014. ISSN 1437-7772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494221> >.

BAYLIN, S. B. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 12, n. 5, p. 331-7, Oct 2002. ISSN 1044-579X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191632> >.

BAYLIN, S. B. et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 7, p. 687-92, Apr 2001. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257100> >.

BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 10, p. 726-34, Oct 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941284> >.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107-16, Feb 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491070> >.

BENEZRA, D. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 38, n. 12, p. 2433-4, Nov 1997. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375559> >.

BERRÉBI, A.; BADIOU, W.; DUCLUSAUD, A. [Frequency, persistence and recurrence of HPV lesions of the uterine cervix in HIV-seropositive women]. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 36, n. 5, p. 521-4, May 2008. ISSN 1297-9589. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486518> >.

BIERKENS, M. et al. CADM1 and MAL promoter methylation levels in hrHPV-positive cervical scrapes increase proportional to degree and duration of underlying cervical disease. **Int J Cancer**, v. 133, n. 6, p. 1293-9, Sep 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23456988> >.

BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**, v. 321, n. 6067, p. 209-13, 1986 May 15-21 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423876> >.

BLITZ, S. et al. Evaluation of HIV and highly active antiretroviral therapy on the natural history of human papillomavirus infection and cervical cytopathologic findings in HIV-positive and high-risk HIV-negative women. **J Infect Dis**, v. 208, n. 3, p. 454-62, Aug 2013. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624362> >.

BOSCH, F. X. et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**, v. 26 Suppl 10, p. K1-16, Aug 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847553> >.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Dis Markers**, v. 23, n. 4, p. 213-27, 2007. ISSN 0278-0240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627057> >.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 4, p. 244-65, Apr 2002. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208> >.

\_\_\_\_\_. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, n. 11, p. 796-802, Jun 1995. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7791229> >.

BRANCA, M. et al. Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 27, n. 3, p. 215-23, 2006. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16800245> >.

BREBI, P. et al. Genome-wide methylation profiling reveals Zinc finger protein 516 (ZNF516) and FK-506-binding protein 6 (FKBP6) promoters frequently methylated in cervical neoplasia, associated with HPV status and ethnicity in a Chilean population. **Epigenetics**, v. 9, n. 2, p. 308-17, Feb 2014. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24241165> >.

BRENTNALL, A. R. et al. A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes. **Int J Cancer**, v. 135, n. 6, p. 1425-32, Sep 2014. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24535756> >.

BROWN, A. J.; TRIMBLE, C. L. New technologies for cervical cancer screening. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 26, n. 2, p. 233-42, Apr 2012. ISSN 1532-1932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22119058> >.

BRYANT, D. et al. Quantitative measurement of Human Papillomavirus type 16 L1/L2 DNA methylation correlates with cervical disease grade. **J Clin Virol**, v. 59, n. 1, p. 24-9, Jan 2014. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24268385> >.

BULKMANS, N. W. et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. **Lancet**, v. 370, n. 9601, p. 1764-72, Nov 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919718> >.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1-17, Jan 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525422> >.

CAMERON, E. E. et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. **Nat Genet**, v. 21, n. 1, p. 103-7, Jan 1999. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916800> >.

CASTLE, P. E. et al. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2. **Obstet Gynecol**, v. 113, n. 1, p. 18-25, Jan 2009. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19104355> >.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964308> >.

CECCATO JUNIOR, B. P. et al. Incidence of Cervical Human Papillomavirus and Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Positive and Negative HIV Status. **Rev Bras Ginecol Obstet**, Apr 2016. ISSN 1806-9339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27123772> >.

CEJTIN, H. E.; MALAPATI, R.; CHAPARALA, S. A comparison of loop electrosurgical excision procedures between human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women. **J Low Genit Tract Dis**, v. 15, n. 1, p. 37-41, Jan 2011. ISSN 1526-0976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192175> >.

CHAN, B. K. et al. Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. **Am J Obstet Gynecol**, v. 200, n. 4, p. 422.e1-9, Apr 2009. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167697> >.

CHAO, T. K. et al. Triage of cervical cytological diagnoses of atypical squamous cells by DNA methylation of paired boxed gene 1 (PAX1). **Diagn Cytopathol**, v. 41,

n. 1, p. 41-6, Jan 2013. ISSN 1097-0339. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710649> >.

CHATURVEDI, A. K. et al. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 16, p. 1120-30, Aug 2009. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648510> >.

CHEN, C. L. et al. E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. **Eur J Cancer**, v. 39, n. 4, p. 517-23, Mar 2003. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751384> >.

CHEUNG, J. L. et al. Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. **Gynecol Oncol**, v. 131, n. 2, p. 374-9, Nov 2013. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24012799> >.

CHUNG, M. H. et al. Comparing Papanicolaou smear, visual inspection with acetic acid and human papillomavirus cervical cancer screening methods among HIV-positive women by immune status and antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 27, n. 18, p. 2909-19, Nov 2013. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842133> >.

CLIFFORD, G. et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/26-34, Aug 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950015> >.

CLIFFORD, G. M. et al. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, n. 18, p. 2337-44, Nov 2006. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17117020> >.

CORRÊA, C. M. et al. Prevalence and multiplicity of HPV in HIV women in Minas Gerais, Brazil. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 4, p. 425-30, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876925> >.

COX, J. T.; MORIARTY, A. T.; CASTLE, P. E. Commentary on: Statement on HPV DNA test utilization. **J Low Genit Tract Dis**, v. 13, n. 3, p. 131-4, Jul 2009. ISSN 1526-0976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550208> >.

CUI, H. et al. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6442-6, Nov 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438232> >.

CUZICK, J. et al. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. **Vaccine**, v. 26 Suppl 10, p. K29-41, Aug 2008. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847555> >.

\_\_\_\_\_. New technologies and procedures for cervical cancer screening. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F107-16, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199953> >.

DAVIS, A. T. et al. Cervical dysplasia in women infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a correlation with HIV viral load and CD4+ count. **Gynecol Oncol**, v. 80, n. 3, p. 350-4, Mar 2001. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263930> >.

DE VUYST, H. et al. Methylation Levels of CADM1, MAL, and MIR124-2 in Cervical Scrapes for Triage of HIV-Infected, High-Risk HPV-Positive Women in Kenya. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 70, n. 3, p. 311-8, Nov 2015. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473640> >.

\_\_\_\_\_. Prevalence and determinants of human papillomavirus infection and cervical lesions in HIV-positive women in Kenya. **Br J Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1624-30, Oct 2012. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033006> >.

DEL MISTRO, A. et al. Long-Term Clinical Outcome after Treatment for High-Grade Cervical Lesions: A Retrospective Monoinstitutional Cohort Study. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 984528, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26180819> >.

DENIS, H.; NDLOVU, M. N.; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO Rep**, v. 12, n. 7, p. 647-56, Jul 2011. ISSN 1469-3178. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660058> >.

DENNY, L. A. et al. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F168-74, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199960> >.

DENSLOW, S. A. et al. Incidence and progression of cervical lesions in women with HIV: a systematic global review. **Int J STD AIDS**, v. 25, n. 3, p. 163-77, Mar 2014. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24216030> >.

DIETRICH, C. S. et al. Risk factors for early cytologic abnormalities after loop electrosurgical excision procedure. **Obstet Gynecol**, v. 99, n. 2, p. 188-92, Feb 2002. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814494> >.

DING, D. C. et al. Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 147, n. 2, p. 215-20, Dec 2009. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819061> >.

DONG, S. M. et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 7, p. 1982-6, Jul 2001. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448914> >.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55-70, Nov 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966> >.

DU, R. et al. Post-treatment human papillomavirus status and recurrence rates in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical intraepithelial neoplasia. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 34, n. 6, p. 548-51, 2013. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24601049> >.

DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. **Mol Cancer**, v. 4, p. 38, 2005. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248899> >.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, May 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164071> >.

ELIT, L. et al. Expectant management versus immediate treatment for low-grade cervical intraepithelial neoplasia : a randomized trial in Canada and Brazil. **Cancer**, v. 117, n. 7, p. 1438-45, Apr 2011. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21425144> >.

ELLERBROCK, T. V. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **JAMA**, v. 283, n. 8, p. 1031-7, Feb 2000. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10697063> >.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 11, p. 1148-59, Mar 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337604> >.

ESTELLER, M. et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 8, p. 3225-9, Apr 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309270> >.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol**, v. 196, n. 1, p. 1-7, Jan 2002. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748635> >.

\_\_\_\_\_. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 1-8, Jan 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712205> >.

EZECHI, O. C. et al. The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic human papilloma virus infection in HIV positive Nigerian women. **Viol J**, v. 11, p. 5, 2014. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433568> >.

FAUSCH, S. C. et al. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3242-9, Sep 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218143> >.

FEINBERG, A. P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 433-40, May 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522677> >.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-53, Feb 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732866> >.

FENG, Q. et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 4, p. 273-82, Feb 2005. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713962> >.

\_\_\_\_\_. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from patients with cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 6, p. 1178-84, Jun 2007. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548682> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> >.

FERNANDEZ, A. F.; ESTELLER, M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. **Oncogene**, v. 29, n. 10, p. 1405-20, Mar 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20101211> >.

FIGUEROA, M. E. et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 13-27, Jan 2010. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060365> >.

FLANNELLY, G. et al. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? **BJOG**, v. 108, n. 10, p. 1025-30, Oct 2001. ISSN 1470-0328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702832> >.

FLATLEY, J. E. et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 10, p. 2782-9, Oct 2009. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755648> >.

FOGLE, R. H. et al. Predictors of cervical dysplasia after the loop electrosurgical excision procedure in an inner-city population. **J Reprod Med**, v. 49, n. 6, p. 481-6, Jun 2004. ISSN 0024-7758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15283059> >.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 4, p. 273-86, Apr 2007. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396134> >.

FOULOT, H. et al. Surgical management of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 141, n. 2, p. 153-7, Dec

2008. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760524> >.

FRISCH, M.; BIGGAR, R. J.; GOEDERT, J. J. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 18, p. 1500-10, Sep 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995805> >.

FRUCHTER, R. G. et al. Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. **Obstet Gynecol**, v. 87, n. 3, p. 338-44, Mar 1996. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598951> >.

FU, Y. et al. Residual disease and risk factors in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and positive margins after initial conization. **Ther Clin Risk Manag**, v. 11, p. 851-6, 2015. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26056463> >.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **J Virol Methods**, v. 122, n. 1, p. 87-93, Dec 2004. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488625> >.

GARDEIL, F. et al. Persistent intraepithelial neoplasia after excision for cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Obstet Gynecol**, v. 89, n. 3, p. 419-22, Mar 1997. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9052597> >.

GHAEM-MAGHAMI, S. et al. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia and risk of treatment failure: a meta-analysis. **Lancet Oncol**, v. 8, n. 11, p. 985-93, Nov 2007. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928267> >.

GONZALEZ, D. I. et al. Recurrence of dysplasia after loop electrosurgical excision procedures with long-term follow-up. **Am J Obstet Gynecol**, v. 184, n. 3, p. 315-21, Feb 2001. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228480> >.

GREENBLATT, R. M.; HESSOL, N. A. **Epidemiology and natural history of HIV infection in women. A guide to the Clinical Care of Women with HIV.** Hopkins University 2001.

GRØNBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1039-59, Oct 2007. ISSN 0903-4641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18042143> >.

GUMBINER, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 8, p. 622-34, Aug 2005. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025097> >.

GÖK, M. et al. HPV16 and increased risk of recurrence after treatment for CIN. **Gynecol Oncol**, v. 104, n. 2, p. 273-5, Feb 2007. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157365> >.

HARRIS, T. G. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions associated with HIV serostatus, CD4 cell counts, and human papillomavirus test results. **JAMA**, v. 293, n. 12, p. 1471-6, Mar 2005. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784870> >.

HATTERMANN, K. et al. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. **Anal Biochem**, v. 377, n. 1, p. 62-71, Jun 2008. ISSN 1096-0309. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384736> >.

HAWES, S. E. et al. DNA hypermethylation of tumors from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. **Lung Cancer**, v. 69, n. 2, p. 172-9, Aug 2010. ISSN 1872-8332. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945765> >.

HEARD, I. et al. High rate of recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after surgery in HIV-positive women. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 39, n. 4, p. 412-8, Aug 2005. ISSN 1525-4135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16010162> >.

\_\_\_\_\_. Highly active antiretroviral therapy enhances regression of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-seropositive women. **AIDS**, v. 16, n. 13, p. 1799-802, Sep 2002. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218392> >.

HENKEN, F. E. et al. Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. **Br J Cancer**, v. 97, n. 10, p. 1457-64, Nov 2007. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971771> >.

HERFS, M. et al. Unique recurrence patterns of cervical intraepithelial neoplasia after excision of the squamocolumnar junction. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. 1043-52, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24839092> >.

HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v. 349, n. 21, p. 2042-54, Nov 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627790> >.

HERMAN, J. G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9821-6, Sep 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8790415> >.

HEYN, H.; ESTELLER, M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 10, p. 679-92, Oct 2012. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945394> >.

HOLOWATY, P. et al. RESPONSE: re: natural history of dysplasia of the uterine cervix. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 16, p. 1420A-1421, Aug 1999. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451450> >.

HONG, D. et al. Methylation status of the long control region of HPV 16 in clinical cervical specimens. **Mol Med Rep**, v. 1, n. 4, p. 555-60, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 1791-2997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479449> >.

HOUSHDARAN, S. et al. DNA methylation profiles of ovarian epithelial carcinoma tumors and cell lines. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9359, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179752> >.

HUCHKO, M. J. et al. Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia 2+ after treatment among HIV-infected women in Western Kenya. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 66, n. 2, p. 188-92, Jun 2014. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662299> >.

\_\_\_\_\_. Outcomes Up to 12 Months After Treatment With Loop Electrosurgical Excision Procedure for Cervical Intraepithelial Neoplasia Among HIV-Infected Women. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 69, n. 2, p. 200-5, Jun 2015. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25647529> >.

ILIOPOULOS, D. et al. Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. **Oncol Rep**, v. 22, n. 1, p. 199-204, Jul 2009. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19513524> >.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. INCA, 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp> >.

ISSA, J. P. et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nat Genet**, v. 7, n. 4, p. 536-40, Aug 1994. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951326> >.

JACINTO, F. V.; ESTELLER, M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1155-60, Aug 2007. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17482895> >.

JEONG, D. H. et al. Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1234-40, 2006 May-Jun 2006. ISSN 1048-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803511> >.

JIN, J.; LI, L.; ZHANG, F. META-ANALYSIS OF HIGH RISK FACTORS OF RESIDUE OR RELAPSE OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AFTER CONIZATION. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 29, n. 2, p. 451-8, 2015 Apr-Jun 2015. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122236> >.

JOHNSON, N. et al. Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia. **BJOG**, v. 110, n. 10, p. 952-5, Oct 2003. ISSN 1470-0328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550367> >.

JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 4, p. 287-99, Apr 2002. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120280> >.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002. ISSN 1471-0056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042769> >.

\_\_\_\_\_. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-92, Feb 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320506> >.

KALANTARI, M. et al. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. **J Med Virol**, v. 82, n. 2, p. 311-20, Feb 2010. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029805> >.

KANAI, Y. et al. DNA hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis. **Cancer Lett**, v. 122, n. 1-2, p. 135-41, Jan 1998. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9464502> >.

KANG, S. et al. Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. **Int J Cancer**, v. 118, n. 9, p. 2168-71, May 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16331610> >.

\_\_\_\_\_. Polymorphism in folate- and methionine-metabolizing enzyme and aberrant CpG island hypermethylation in uterine cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 96, n. 1, p. 173-80, Jan 2005. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589597> >.

KATKI, H. A. et al. Five-year risk of recurrence after treatment of CIN 2, CIN 3, or AIS: performance of HPV and Pap cotesting in posttreatment management. **J Low Genit Tract Dis**, v. 17, n. 5 Suppl 1, p. S78-84, Apr 2013. ISSN 1526-0976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519309> >.

KIM, J. H. et al. Assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens. **Gynecol Oncol**, v. 116, n. 1, p. 99-104, Jan 2010. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836067> >.

KINNEY, W.; STOLER, M. H.; CASTLE, P. E. Special commentary: patient safety and the next generation of HPV DNA tests. **Am J Clin Pathol**, v. 134, n. 2, p. 193-9, Aug 2010. ISSN 1943-7722. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660320> >.

KITCHENER, H. C. et al. HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia. **BJOG**, v. 115, n. 8, p. 1001-7, Jul 2008. ISSN 1471-0528. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503572> >.

KODAMPUR, M. et al. Endocervical crypt involvement by high-grade cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of transformation zone: do we need a different follow-up strategy? **J Obstet Gynaecol Res**, v. 39, n. 1, p. 280-6, Jan 2013. ISSN 1447-0756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22765238> >.

KONG, T. W. et al. Value of endocervical margin and high-risk human papillomavirus status after conization for high-grade cervical intraepithelial neoplasia, adenocarcinoma in situ, and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol**, v. 135, n. 3, p. 468-73, Dec 2014. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25284039> >.

KORIYAMA, C. et al. E-cadherin and beta-catenin expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and their prognostic significance. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 29, p. 3925-31, Aug 2007. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663505> >.

KOSHIOL, J. et al. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **Am J Epidemiol**, v. 168, n. 2, p. 123-37, Jul 2008. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483125> >.

LAI, H. C. et al. Quantitative DNA methylation analysis detects cervical intraepithelial neoplasms type 3 and worse. **Cancer**, v. 116, n. 18, p. 4266-74, Sep 2010. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564139> >.

LAIRD, P. W. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. **Mol Med Today**, v. 3, n. 5, p. 223-9, May 1997. ISSN 1357-4310. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176885> >.

LEVI, J. E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecol Oncol**, v. 92, n. 1, p. 225-31, Jan 2004. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751163> >.

\_\_\_\_\_. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 9, p. 3341-5, Sep 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202576> >.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **Int J Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-35, Feb 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473886> >.

LICHTENSTEIN, P. et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **N Engl J Med**, v. 343, n. 2, p. 78-85, Jul 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891514> >.

LIMA, M. I. et al. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 104, n. 2, p. 100-4, Feb 2009. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19062013> >.

LIMA, M. I. M. **Incidência de recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais após conização por cirurgia de alta frequência em portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana**. 2005. 130 (Tese Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LIN, C. J. et al. Testing for methylated PCDH10 or WT1 is superior to the HPV test in detecting severe neoplasms (CIN3 or greater) in the triage of ASC-US smear results. **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, n. 1, p. 21.e1-7, Jan 2011. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833385> >.

LIN, Z. et al. The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 131, n. 6, p. 364-70, Jun 2005. ISSN 0171-5216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785933> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LODI, C. T. et al. Factors associated with recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization in HIV-infected and noninfected women. **Arch Gynecol Obstet**, v. 284, n. 1, p. 191-7, Jul 2011. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20680314> >.

LODI, C. T. C. **Fatores de risco para recidiva de lesões intraepiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas à conização por cirurgia de alta frequência**. 2009. 122 (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

LORINCZ, A. T. The Promise and the Problems of Epigenetics Biomarkers in Cancer. **Expert Opin Med Diagn**, v. 5, n. 5, p. 375-379, Sep 2011. ISSN 1753-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003365> >.

\_\_\_\_\_. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 14, n. 3, p. 293-305, Apr 2014. ISSN 1744-8352. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649818> >.

LORINCZ, A. T. et al. HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. **Int**

**J Cancer**, v. 133, n. 3, p. 637-44, Aug 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335178> >.

\_\_\_\_\_. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet Gynecol**, v. 79, n. 3, p. 328-37, Mar 1992. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310805> >.

LUBRANO, A. et al. Follow-up after LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2-CIN 3 in a single institution. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 161, n. 1, p. 71-4, Mar 2012. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177836> >.

LUHN, P. et al. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. **Gynecol Oncol**, v. 128, n. 2, p. 265-70, Feb 2013. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23146688> >.

MALAPATI, R.; CHAPARALA, S.; CEJTIN, H. E. Factors influencing persistence or recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after loop electrosurgical excision procedure. **J Low Genit Tract Dis**, v. 15, n. 3, p. 177-9, Jul 2011. ISSN 1526-0976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716049> >.

MALUF, P. J.; ADAD, S. J.; MURTA, E. F. Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to the crypts and mitoses. **Tumori**, v. 90, n. 5, p. 473-7, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 0300-8916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15656332> >.

MALUF, P. J. et al. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Arch Gynecol Obstet**, v. 278, n. 6, p. 525-30, Dec 2008. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343936> >.

MANCHANDA, R. et al. Effect of margin status on cervical intraepithelial neoplasia recurrence following LLETZ in women over 50 years. **BJOG**, v. 115, n. 10, p. 1238-42, Sep 2008. ISSN 1471-0528. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18715408> >.

MARGISON, G. P. et al. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 4, p. 625-35, Apr 2003. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727789> >.

MASSAD, L. S. et al. Outcomes after treatment of cervical intraepithelial neoplasia among women with HIV. **J Low Genit Tract Dis**, v. 11, n. 2, p. 90-7, Apr 2007. ISSN 1089-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415113> >.

\_\_\_\_\_. Incidence of cervical precancers among HIV-seropositive women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 212, n. 5, p. 606.e1-8, May 2015. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25499260> >.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol**, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001. ISSN 0959-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11422538> >.

MELNIKOW, J. et al. Cervical intraepithelial neoplasia outcomes after treatment: long-term follow-up from the British Columbia Cohort Study. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 721-8, May 2009. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436026> >.

MENG, Q. W. et al. [Prognostic factors of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions treated by cold knife conization with negative margin]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 42, n. 7, p. 457-9, Jul 2007. ISSN 0529-567X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961334> >.

MICHELIN, M. A.; OLIVEIRA, H. S.; MURTA, E. F. C. **Resposta Imune nas lesões intraepiteliais do colo uterino. FEMINA**. 36: 9-13 p. 2008.

MILOJKOVIC, M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 76, n. 1, p. 49-53, Jan 2002. ISSN 0020-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818094> >.

MIRABELLO, L. et al. Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer**, v. 132, n. 6, p. 1412-22, Mar 2013. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847263> >.

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, n. 42, p. 6479-83, Sep 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528271> >.

MONSONEGO, J. et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. **Int J Cancer**, v. 108, n. 3, p. 329-33, Jan 2004. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14648697> >.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-60, Aug 2010. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592731> >.

MOORE, D. H. Cervical cancer. **Obstet Gynecol**, v. 107, n. 5, p. 1152-61, May 2006. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648423> >.

MORGAN, H. D. et al. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J Biol Chem**, v. 279, n. 50, p. 52353-60, Dec 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448152> >.

MORSE, D. L. et al. Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Anal Biochem**, v. 342, n. 1, p. 69-77, Jul

2005. ISSN 0003-2697. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958182> >.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 68, n. 1, p. 1-11, Oct 2008. ISSN 1040-8428. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430583> >.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 2003. ISSN 1533-4406. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259> >.

\_\_\_\_\_. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 2006. ISSN 0264-410X. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995> >.

MYÖHÄNEN, S. K.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. **Cancer Res**, v. 58, n. 4, p. 591-3, Feb 1998. ISSN 0008-5472. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485004> >.

MZARICO, E. et al. Relationship between smoking, HPV infection, and risk of Cervical cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 36, n. 6, p. 677-80, 2015. ISSN 0392-2936. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775350> >.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb 2006. ISSN 0008-6363. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877> >.

NAGI, C. S.; SCHLOSSHAUER, P. W. Endocervical glandular involvement is associated with high-grade SIL. **Gynecol Oncol**, v. 102, n. 2, p. 240-3, Aug 2006. ISSN 0090-8258. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472847> >.

NAM, K. et al. Factors associated with HPV persistence after conization in patients with negative margins. **J Gynecol Oncol**, v. 20, n. 2, p. 91-5, Jun 2009. ISSN 2005-0380. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590719> >.

NAPPI, L. et al. Cervical squamous intraepithelial lesions of low-grade in HIV-infected women: recurrence, persistence, and progression, in treated and untreated women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 121, n. 2, p. 226-32, Aug 2005. ISSN 0301-2115. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054967> >.

NARAYAN, G. et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. **Mol Cancer**, v. 2, p. 24, May 2003. ISSN 1476-4598. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773202> >.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Sci**, v. 98, n. 10, p. 1505-11, Oct 2007. ISSN 1347-9032. Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645777> >.

NAUCLER, P. et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 357, n. 16, p. 1589-97, Oct 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942872> >.

NYE, M. D. et al. Associations between methylation of paternally expressed gene 3 (PEG3), cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56325, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418553> >.

OLIVEIRA, C. A. et al. Risk of persistent high-grade squamous intraepithelial lesion after electrosurgical excisional treatment with positive margins: a meta-analysis. **Sao Paulo Med J**, v. 130, n. 2, p. 119-25, 2012. ISSN 1806-9460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481759> >.

PANTANOWITZ, L. Treatment failure and recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **Womens Health (Lond Engl)**, v. 6, n. 6, p. 781-3, Nov 2010. ISSN 1745-5065. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118036> >.

PARASKEVAIDIS, E. et al. Pattern of treatment failure following laser for cervical intraepithelial neoplasia: implications for follow-up protocol. **Obstet Gynecol**, v. 78, n. 1, p. 80-3, Jul 1991. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2047073> >.

\_\_\_\_\_. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 24, n. 6, p. 541-3, 2003. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14658599> >.

PARKIN, D. M. et al. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int J Cancer**, v. 94, n. 2, p. 153-6, Oct 2001. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11668491> >.

PATRELLI, T. S. et al. Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy on the Natural History of Cervical Precancerous Lesions: A 17-Year Institutional Longitudinal Cohort Study. **Reprod Sci**, v. 21, n. 7, p. 837-845, Dec 2013. ISSN 1933-7205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336675> >.

PINTO, V. M. et al. Cervical cytology and histopathologic abnormalities in women living with AIDS in São Paulo, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 57 Suppl 3, p. S212-6, Aug 2011. ISSN 1944-7884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21857321> >.

PLUTA, A. et al. The role of p73 in hematological malignancies. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 757-66, May 2006. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541141> >.

PRATO, B. et al. Correlation of recurrence rates and times with posttreatment human papillomavirus status in patients treated with loop electrosurgical excision procedure conization for cervical squamous intraepithelial lesions. **Int J Gynecol**

**Cancer**, v. 18, n. 1, p. 90-4, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1525-1438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506849> >.

QURESHI, S. A.; BASHIR, M. U.; YAQINUDDIN, A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. **Int J Surg**, v. 8, n. 3, p. 194-8, 2010. ISSN 1743-9159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139036> >.

REN, C. C. et al. Methylation status of the fragile histidine triad and E-cadherin genes in plasma of cervical cancer patients. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 5, p. 1862-7, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 1048-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009983> >.

RICHART, R. M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol Annu**, v. 8, p. 301-28, 1973. ISSN 0079-0184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4583016> >.

RICHART, R. M.; BARRON, B. A. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 105, n. 3, p. 386-93, Oct 1969. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5810787> >.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 2, p. 551-4, Feb 2003. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576417> >.

RUSSOMANO, F. et al. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-infected women treated by means of electrosurgical excision of the transformation zone (LLETZ) in Rio de Janeiro, Brazil. **Sao Paulo Med J**, v. 131, n. 6, p. 405-10, 2013. ISSN 1806-9460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346780> >.

RYU, A. et al. Early human papillomavirus testing predicts residual/recurrent disease after LEEP. **J Gynecol Oncol**, v. 23, n. 4, p. 217-25, Oct 2012. ISSN 2005-0399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094124> >.

SAAVEDRA, K. P.; BREBI, P. M.; ROA, J. C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clin Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 13, 2012. ISSN 1868-7083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22938091> >.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, Sep 2007. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826171> >.

SERATI, M. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 165, n. 1, p. 86-90, Nov 2012. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771223> >.

SHARMA, S. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. **Anticancer Res**, v. 29, n. 10, p. 3759-68, Oct 2009. ISSN 1791-7530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846906> >.

SHINOJIMA, T. et al. Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer. **Epigenetics**, v. 7, n. 11, p. 1279-89, Nov 2012. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023649> >.

SHIVAPURKAR, N. et al. Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 107, n. 3, p. 549-53, Dec 2007. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17894941> >.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4059-70, Jun 1999. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361102> >.

SINGH, M. et al. Regulation of cell growth through cell cycle arrest and apoptosis in HPV 16 positive human cervical cancer cells by tea polyphenols. **Invest New Drugs**, v. 28, n. 3, p. 216-24, Jun 2010. ISSN 1573-0646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19271153> >.

SKINNER, E. N.; GEHRIG, P. A.; VAN LE, L. High-grade squamous intraepithelial lesions: abbreviating posttreatment surveillance. **Obstet Gynecol**, v. 103, n. 3, p. 488-92, Mar 2004. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990411> >.

SPATHIS, A. et al. Promoter methylation of p16(INK4A), hMLH1, and MGMT in liquid-based cervical cytology samples compared with clinicopathological findings and HPV presence. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 2011, p. 927861, 2011. ISSN 1098-0997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747645> >.

SPINILLO, A. et al. Multiple human papillomavirus infection with or without type 16 and risk of cervical intraepithelial neoplasia among women with cervical cytological abnormalities. **Cancer Causes Control**, v. 25, n. 12, p. 1669-76, Dec 2014. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25296710> >.

STANLEY, M. HPV - immune response to infection and vaccination. **Infect Agent Cancer**, v. 5, p. 19, 2010. ISSN 1750-9378. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961432> >.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol Oncol**, v. 107, n. 2 Suppl 1, p. S2-5, Nov 2007. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938014> >.

SUN, L. L. et al. Population-based case-control study on DAPK1, RAR- $\beta$ 2 and MGMT methylation in liquid-based cytology. **Arch Gynecol Obstet**, v. 285, n. 5, p. 1433-9, May 2012. ISSN 1432-0711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116316> >.

SZALMÁS, A.; KÓNYA, J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 3, p. 144-52, Jun 2009. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429477> >.

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicol Sci**, v. 100, n. 1, p. 7-23, Nov 2007. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675334> >.

TEIXEIRA, N. C. et al. Prevalence and risk factors for cervical intraepithelial neoplasia among HIV-infected women. **Braz J Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 164-9, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552459> >.

TEODORIDIS, J. M. et al. CpG-island methylation and epigenetic control of resistance to chemotherapy. **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 6, p. 916-7, Dec 2004. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15506923> >.

TERRA, A. P. et al. Aberrant promoter methylation can be useful as a marker of recurrent disease in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Tumori**, v. 93, n. 6, p. 572-9, 2007 Nov-Dec 2007. ISSN 0300-8916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18338492> >.

THOMISON, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Hum Pathol**, v. 39, n. 2, p. 154-66, Feb 2008. ISSN 0046-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206494> >.

TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome--components and functional correlates. **Genes Dev**, v. 20, n. 23, p. 3215-31, Dec 2006. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158741> >.

TOYOTA, M. et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8681-6, Jul 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411935> >.

TSAI, C. N. et al. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 15, p. 10084-9, Jul 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110730> >.

TURAN, T. et al. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? **Virology**, v. 349, n. 1, p. 175-83, May 2006. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472835> >.

\_\_\_\_\_. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. **Virology**, v. 361, n. 1, p. 185-93, Apr 2007. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175003> >.

TYLER, L. N. et al. Significance of margin and extent of dysplasia in loop electrosurgery excision procedure biopsies performed for high-grade squamous intraepithelial lesion in predicting persistent disease. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, n. 4, p. 622-4, Apr 2007. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425396> >.

USHIJIMA, T.; ASADA, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, v. 101, n. 2, p. 300-5, Feb 2010. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19958364> >.

VALERI, N. et al. Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. **Mamm Genome**, v. 20, n. 9-10, p. 573-80, 2009 Sep-Oct 2009. ISSN 1432-1777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19697081> >.

VAN BOGAERT, L. J. Histometry of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and LEEP excision margin in HIV-infected and uninfected women. **Anal Quant Cytopathol Histopathol**, v. 36, n. 4, p. 183-8, Aug 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291855> >.

\_\_\_\_\_. Involved LEEP excision margins as predictor of residual/recurrent disease in HIV-positive and HIV-negative women in a low-resource setting. **Anal Quant Cytopathol Histopathol**, v. 37, n. 2, p. 105-8, Apr 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26065230> >.

VAN HAMONT, D. et al. Long-term follow-up after large-loop excision of the transformation zone: evaluation of 22 years treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Gynecol Cancer**, v. 16, n. 2, p. 615-9, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1048-891X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16681735> >.

VASILJEVIĆ, N. et al. A comparison of methylation levels in HPV18, HPV31 and HPV33 genomes reveals similar associations with cervical precancers. **J Clin Virol**, v. 59, n. 3, p. 161-6, Mar 2014. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468012> >.

VELDHUIJZEN, N. J. et al. The epidemiology of human papillomavirus infection in HIV-positive and HIV-negative high-risk women in Kigali, Rwanda. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 333, 2011. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136570> >.

VERGUTS, J. et al. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. **BJOG**, v. 113, n. 11, p. 1303-7, Nov 2006. ISSN 1470-0328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978225> >.

VERMA, M. Viral genes and methylation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 983, p. 170-80, Mar 2003. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724222> >.

VIDAL, A. C. et al. PEG1/MEST and IGF2 DNA methylation in CIN and in cervical cancer. **Clin Transl Oncol**, v. 16, n. 3, p. 266-72, Mar 2014. ISSN 1699-3055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775149> >.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 321-41, 1997. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111869> >.

VIRMANI, A. K. et al. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 584-9, Mar 2001. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297252> >.

WAJED, S. A.; LAIRD, P. W.; DEMEESTER, T. R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. **Ann Surg**, v. 234, n. 1, p. 10-20, Jul 2001. ISSN 0003-4932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420478> >.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, v. 189, n. 1, p. 12-9, Sep 1999. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451482> >.

WANG, C. Y. et al. A novel action mechanism for MPT0G013, a derivative of arylsulfonamide, inhibits tumor angiogenesis through up-regulation of TIMP3 expression. **Oncotarget**, v. 5, n. 20, p. 9838-50, Oct 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226613> >.

WENTZENSEN, N. et al. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. **Gynecol Oncol**, v. 112, n. 2, p. 293-9, Feb 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054549> >.

\_\_\_\_\_. Methylation of HPV18, HPV31, and HPV45 genomes and cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **J Natl Cancer Inst**, v. 104, n. 22, p. 1738-49, Nov 2012. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23093560> >.

WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Biomarkers in cervical cancer screening. **Dis Markers**, v. 23, n. 4, p. 315-30, 2007. ISSN 0278-0240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627065> >.

WIDSCHWENDTER, A. et al. Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 10, p. 3396-400, May 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15161694> >.

\_\_\_\_\_. CDH1 and CDH13 methylation in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. **Int J Cancer**, v. 109, n. 2, p. 163-6, Mar 2004. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14750164> >.

WILSON, A. S.; POWER, B. E.; MOLLOY, P. L. DNA hypomethylation and human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1775, n. 1, p. 138-62, Jan 2007. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045745> >.

WILTING, S. M. et al. Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. **Mol Cancer**, v. 9, p. 167, 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20579385> >.

WISMAN, G. B. et al. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. **Int J Cancer**, v. 119, n. 8, p. 1908-14, Oct 2006. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736496> >.

WRIGHT, T. C. et al. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. **Obstet Gynecol**, v. 84, n. 4, p. 591-7, Oct 1994. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090399> >.

WU, D. et al. Prediction of residual/recurrent disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 51, n. 2, p. 114-8, Apr 2011. ISSN 1479-828X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466511> >.

WU, J. et al. Analysis of Residual/Recurrent Disease and Its Risk Factors after Loop Electrosurgical Excision Procedure for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Gynecol Obstet Invest**, Sep 2015. ISSN 1423-002X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26337009> >.

WU, Y. et al. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. **BMC Cancer**, v. 10, p. 32, 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132554> >.

YANG, H. J. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. **Chin J Cancer**, v. 32, n. 1, p. 42-8, Jan 2013. ISSN 1000-467X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22943599> >.

YANG, N.; COUKOS, G.; ZHANG, L. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. **Int J Cancer**, v. 122, n. 5, p. 963-8, Mar 2008. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098137> >.

YANG, N. et al. Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. **Cell Oncol**, v. 32, n. 1-2, p. 131-43, 2010. ISSN 1875-8606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208141> >.

ZAITOUN, A. M. et al. Completeness of excision and follow up cytology in patients treated with loop excision biopsy. **J Clin Pathol**, v. 53, n. 3, p. 191-6, Mar 2000. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823137> >.

ZAMBRANO, P. et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. **BMC Cancer**, v. 5, p. 44, 2005. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862127> >.

ZEIER, M. D. et al. Impact of timing of antiretroviral therapy initiation on survival of cervical squamous intraepithelial lesions: a cohort analysis from South Africa. **Int J STD AIDS**, v. 23, n. 12, p. 890-6, Dec 2012. ISSN 1758-1052. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258831> >.

ZHANG, H. Y. et al. The diversity of human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus-infected women in Yunnan, China. **Viol J**, v. 11, p. 202, 2014. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25481842> >.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 9, p. 690-8, May 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793105> >.

\_\_\_\_\_. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260-5, Feb 2009. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135222> >.

## ANEXOS E APÊNDICES

### ANEXO A– PARECER CEP UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL DE EXPRESSÃO E METILAÇÃO DOS RECEPTORES DE GENES COMO FATORES PREDITORES PARA RÉCIDIVA DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUENCIA.

**Pesquisador:** VICTOR HUGO DE MELO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 44843114.8.0000.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.182.951

**Data da Relatoria:** 09/07/2015

##### Apresentação do Projeto:

O carcinoma do colo uterino é uma doença com múltiplos determinantes ambientais e genéticos. As infecções genitais, especialmente as associadas ao papilomavírus humano (HPV) de alto risco, e o comprometimento da resposta imune celular são fatores diretamente envolvidos no processo de transformação maligna (ZUR HAUSEN, 2002). Em mulheres infectadas pelo HIV, a prevalência de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) é mais alta quando comparada com mulheres não infectadas (DAVIS et al.,2001). Também se observa maior prevalência de infecção pelo HPV (PALEFSKY et al.,1999; SOUZA et al.,2001) nas mulheres infectadas pelo HIV, assim como as lesões cervicais induzidas pelo HPV evoluem mais rapidamente e regredem mais lentamente (KOBAYASHI et al.,2004). A NIC pode permanecer em estágio não invasivo por até 20 anos e não evoluir necessariamente para câncer, podendo, inclusive, regredir espontaneamente (KUMAR et al.,2005) Trata-se de projeto que visa estudar o perfil de expressão e metilação dos receptores de genes, em mulheres infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), portadoras de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), submetidas à cirurgia de alta frequência (CAF), que apresentaram recidiva ou não da NIC. Estimou-se que, para alcançar poder estatístico de 90%, será necessário estudar 33 peças de mulheres que apresentaram recidiva de NIC e 105 peças de

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.182.951

mulheres que não apresentaram recidiva.

**METODOLOGIA:**

**ESTUDO CASO-CONTROLE** a partir de peças de conização do colo uterino - obtidas por cirurgia de alta frequência (CAF) - de mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV, com diagnóstico de neoplasia intraepitelial cervical prévia, e que apresentaram ou não recidiva da lesão. As pacientes infectadas pelo HIV fazem parte do Programa Multicêntrico para Controle e Prevenção das Lesões Cervicais de Alto Grau e do Câncer Cérvico-Uterino em Mulheres Portadoras do HIV, aprovado pelo COEP em 2002 (COEP 089/02). As pacientes não infectadas para o HIV foram oriundas do Posto de Atendimento da Sagrada Família (Serviço de Patologia do Colo) Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Todo o material a ser utilizado neste projeto, já fez parte do projeto "Fatores de risco para recidiva de lesões intraepiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas a conização por cirurgia de alta frequência" aprovado em 02/08/2007 pelo COEP da UFMG (numero 239/07) e em 03/03/2008 pelo CEP da SMSA/PBH (número 060/2007) e COEP da UFMG 0526.0.203000-09. Variável desfecho: ocorrência de recidiva ou não de NIC Variáveis preditoras: aspectos sociodemográficas e comportamentais (idade, paridade, numero de parceiros, tabagismo, idade de inicio de vida sexual); grau de lesão; avaliação de margens e ocupação glandular da peça cirúrgica; infecção pelo HIV; infecção pelo HPV; expressão e metilação dos genes RAR $\beta$ , MGMT, TIMP3, CDH13, RASSF1A.

- **PACIENTES:** Neste estudo serão utilizados peças de conização cervical arquivadas desde 2000, e que já foram analisadas no Programa Multicêntrico já aprovado pelo COEP (COEP 089/02), no projeto de pesquisa aprovado em 02/08/2007 COEP da UFMG (numero 239/07) e em 03/03/2008 pelo CEP da SMSA/PBH (número 060/2007), e COEP da UFMG 0526.0.203000-09. Serão considerados casos as pacientes que apresentaram recidiva de NIC e serão considerados controles as pacientes que não tiveram recidiva de NIC.

- **MÉTODOS PEÇAS DE CONIZAÇÃO:** O material será examinado no Laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba. Serão realizados cortes histológicos nas peças cirúrgicas (blocos de parafina) e o material será submetido a desparafinização, seguido de extração de DNA e posterior análise pela Reação da Polimerase em Cadeia Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), para quantificar a expressão dos seguintes genes receptores: RAR $\beta$ , MGMT, TIMP3, CDH13, RASSF1A. Será também realizada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detectar a presença do DNA HPV de alto risco. Técnica de desparafinização: Para realização da técnica de PCR, os blocos de parafina serão submetidos à extração de DNA, seguindo o protocolo descrito por Wright & Manos (1990), com modificações.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.182.951

- **MÉTODO DE PCR METILAÇÃO DNA:** - As amostras serão quantificadas no equipamento Qubit, e também será verificado o grau de pureza usando um espectrofotômetro. O RNA extraído será convertido em cDNA (vide protocolos "Extração de RNA" – "Trizol Reagent" e "Transcrição reversa - SuperScript® III First-Strand cDNA Synthesis"). - Após o término da reação de PCR, novamente analisar a "Curva de dissociação" para cada par de primers, a qual deve ter apenas um pico. Realizar a análise desejada com os dados (valores de Ct) obtidos.

- **MÉTODO DE PCR SEQUENCIAMENTO PARA DETECÇÃO DO DNA-HPV:** Uma das etapas mais importantes do Sequenciamento de DNA é a própria reação de sequenciamento. Esta reação é similar a uma reação de PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificado.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Avaliar a expressão dos genes RAR $\beta$ , MGMT, TIMP3, CDH13, RASSF1A e a participação da metilação no controle da expressão destas moléculas em mulheres com recidiva de neoplasia intraepitelial cervical ou não.

#### Objetivos Secundários:

- Avaliar a expressão dos mesmos genes como fatores preditivos positivos para a recidiva de NIC.
- Avaliar se a expressão destes genes está relacionada com o grau da NIC.
- Avaliar se as presenças das infecções pelo HIV e/ou do HPV interferem na expressão destes genes.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** O estudo proposto será realizado a partir de peças de conização (CAF) já estocadas, não havendo, portanto, nenhum prejuízo para as pacientes do ponto de vista ético. Já existe autorização das pacientes para a realização deste tipo de estudo.

**Benefícios:** Os benefícios gerais que poderão ser obtidos dependerão das conclusões no final deste estudo.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de tese de doutorado que serão utilizados recursos próprios dos pesquisadores envolvidos e do IPON. Este projeto faz parte da Rede de Oncologia de Minas Gerais, financiada pela FAPEMIG. Apresenta objetivos e metodologia bem definidos. O material parafinado foi estocado originalmente em laboratórios da rede, de acordo com o fluxo de atendimento do Sistema Único de Saúde (SUS). O material a ser utilizado na presente pesquisa já foi recolhido para ser avaliado em estudo anterior e, atualmente, encontra-se estocado no Laboratório do Instituto de Pesquisa

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3408-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.182.951

em Oncologia (IPON), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba, onde será novamente processado para a realização do presente estudo. O Laboratório do IPON possui toda a infraestrutura física, de recursos humanos e financeiros, necessários para o desenvolvimento do estudo.

Previsão de término da pesquisa em 22/12/2017.

As solicitações do COEP foram parcialmente atendidas:

- Acrescentados os riscos ao Projeto e ao TCLE.
- Adicionada a Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte como coparticipante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Presentes:

- Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pelo diretor da Faculdade de Medicina e pesquisador.
- Projeto no formato da Plataforma Brasil e detalhado.
- TCLE
- Parecer substanciado e com aprovação do Depto. de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG.
- Carta de aprovação de projeto anterior.

Não foram apresentados:

- Anuência institucional do Laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), em Uberaba.

**Recomendações:**

GENTILEZA:

- Mudar no TCLE o número do telefone do COEP-UFMG para 3409-4592 e o email para coep@prpq.ufmg.br, acrescentar nome e-mail e telefone do orientador e do doutorando (celulares, se possível).
- No item do TCLE "QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?" retirar a frase "Não há riscos" e acrescentar que "o único risco é a quebra de sigilo, mas serão minimizados pelo armazenamento adequado dos resultados dos exames".
- Acrescentar ao TCLE que as dúvidas éticas serão esclarecidas com os Comitês de ética envolvidos e as demais dúvidas com os pesquisadores.
- Como o TCLE consta de duas páginas, deve-se lembrar que a folha deverá ser rubricada por ambos.
- Inserir na Plataforma Brasil a Anuência institucional do Laboratório do Instituto de Pesquisa em

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.182.951

Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), em Uberaba. Reinserir o TCLE com correções.

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa e solicita-se o reenvio em breve de relatório parcial da pesquisa já com as modificações sugeridas (TCLE e anuência).

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

Somos favoráveis à aprovação do projeto "PERFIL DE EXPRESSÃO E METILAÇÃO DOS RECEPTORES DE GENES COMO FATORES PREDITORES PARA RECIDIVA DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL EM MULHERES INFECTADAS E NÃO INFECTADAS PELO HIV, SUBMETIDAS À CONIZAÇÃO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA" do Pesquisador Prof. Dr. VICTOR HUGO DE MELO.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 17 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:**  
**Telma Campos Medeiros Lorentz**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3408-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

**ANEXO B – Parecer do COEP UFMG**

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
------	--

**Parecer nº. ETIC 239/07**

**Interessado(a): Prof. Vitor Hugo de Melo  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia  
Faculdade de Medicina-UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de agosto de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"O Papilomavírus Humano como fator de risco para recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas a conização por cirurgia de alta frequência"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO C- Parecer do CEP SMSA/PBH



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE (CEP-SMSA/PBH)

#### **Avaliação de adendo ao projeto de pesquisa – Protocolo 060/2007**

**Nome do Projeto:** O Papilomavírus humano como fator de risco para recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV, submetidas à conização por cirurgia de alta frequência.

**Pesquisador responsável:** Victor Hugo de Melo - Mestranda Claudia Teixeira Lodi

Trata-se de um estudo de caso-controle com os seguintes objetivos:

- Avaliar a prevalência do Papiloma vírus humano (HPV) em pacientes soropositivo e soronegativo para o HIV, submetidas a cirurgia de alta frequência (CAF), que apresentaram recidiva das lesões intra-epiteliais cervicais.
- Avaliar se o HPV de alto risco foi fator de risco para recidiva dessas lesões intra-epiteliais cervicais.
- Avaliar a relação entre a gravidade das lesões que recidivaram com o tipo de HPV.

O estudo será realizado a partir de peças de conização do colo uterino de pacientes HIV+ atendidas no CTR (que fazem parte do Programa multicêntrico para Controle e Prevenção das lesões cervicais de alto grau e do câncer cervico-uterino em mulheres portadoras do HIV) e de pacientes HIV- oriundas do PAM Sagrada Família. As pacientes serão abordadas durante consulta de retornos já agendados. As que não têm retorno agendado serão solicitadas a comparecer ao PAM ou CTR. Serão contatadas para obtenção do TCLE. Havendo concordância da paciente, uma cópia do TCLE será enviada ao Laboratório Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatológicas, que fornecerá o bloco parafinado para análise no Laboratório das Interações celulares, departamento de Morfologia do ICB.

Os casos serão as amostras com recidiva e os controles as que não recidivaram. Estimativa de tamanho de amostra: 43 peças de pacientes HIV+ e 59 de pacientes HIV-, para alcançar poder estatístico de 90%. A casuística será composta de material parafinado de 94 pacientes HIV+ e 107 HIV-.

O material parafinado está estocado no Laboratório Municipal de Referência de Análises Clínicas e Citopatológicas, que foram objeto de estudo da Tese de Doutorado de Maria Inês Miranda Lima (período de 1999 a 2003). Os testes moleculares de detecção e tipagem do HPV serão realizados no Laboratório de Biologia das Interações Celulares, do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG.

Será realizada análise univariada e multivariada para estudo de associação entre variáveis categóricas. A variável resposta principal é a ocorrência de recidiva de lesão em pacientes HIV+ e HIV-; as covariáveis são o resultado do HPV e o tipo de HPV. A comparação entre os grupos será feita pelo teste Qui-quadrado de Pearson e análise de variância.

**Parecer:**

O projeto acima referido cumpriu os requisitos da resolução 196/96 da CONEP, tendo sido aprovado na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao CEP um ano após início do projeto ou ao final desde, se em prazo inferior a um ano.

  
Celeste de Souza Rodrigues  
Coordenadora do CEP-SMSA/PBH

Celeste de Souza Rodrigues - BM. 37316-4  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - SMSA/BH

Belo Horizonte, 03 de março de 2008.

## ANEXO D – Diagnóstico Sorológico da Infecção pelo HIV

### (comentários sobre a Portaria 488/98 do Ministério da Saúde)

A fim de maximizar o grau de confiabilidade na emissão dos laudos, bem como minimizar a ocorrência dos resultados falso-negativos ou falso-positivos, o Ministério da Saúde, através da Portaria número 488, de 17 de junho de 1998, estabelece a obrigatoriedade de um conjunto de procedimentos sequenciados para os testes que visam a detectar anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de dois anos.

Ao chegar a um laboratório, com uma solicitação de teste anti-HIV, o indivíduo tem sua amostra de sangue coletada. Após a coleta, esta amostra é centrifugada, para obtenção do soro ou plasma que será utilizado nos testes.

A amostra de soro ou plasma deve ser inicialmente submetida à primeira etapa do conjunto de procedimentos sequenciados obrigatórios previstos na Portaria, denominada etapa de triagem sorológica.

Nessa etapa, a amostra deve ser submetida a dois testes distintos, e paralelo. Esses dois testes, denominados teste 1 e 2, devem possuir princípios metodológicos e/ou antígenos diferentes e, pelo menos um deles, deve ser capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2. Além disso, todos os conjuntos de diagnóstico (*Kits*) utilizados para a realização dos testes devem estar registrados no Ministério da Saúde.

Após a realização da etapa de triagem sorológica, podemos encontrar 3 situações:

1- Caso a amostra apresente resultados não reagentes nos dois testes, terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV". Neste caso, o resultado é liberado para o paciente.

2- Caso a amostra apresente resultados reagentes nos dois testes, deverá ser submetida à etapa de confirmação sorológica prevista na Portaria.

3- Caso a amostra apresente resultados discordantes ou indeterminados nos testes 1 e 2, deverá ser retestada e duplicata, com os mesmos conjuntos de diagnóstico (1 e 2).

Após a retestagem em duplicata, podemos encontrar:

1- Caso a amostra apresente resultados não reagentes nos dois testes, terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV". Neste caso, o resultado é liberado para o paciente.

2- Caso a amostra possua resultados reagentes, discordantes ou indeterminados nos dois testes, deve ser submetida à etapa de confirmação sorológica.

A seguir vem a etapa de confirmação sorológica. Esta etapa deve ser realizada em amostras que apresentarem resultados que necessitem de confirmação. Neste caso, o Ministério da Saúde preconiza a realização dos testes de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou *Western Blot* (WB).

Na maioria dos casos, amostras que necessitem ter seu resultado confirmado são elucidadas através do teste de IFI. Em alguns casos, além deste, é necessária a realização do teste WB.

Resumindo, após a realização da etapa de triagem, podemos ter duas situações em que há necessidade de confirmação do resultado:

1- amostras que possuam resultados reagentes nos testes 1 e 2

2- amostras que possuam resultados discordantes ou indeterminados nos testes 1 e 2.

Uma vez realizado o teste de IFI, podemos encontrar duas situações distintas:

1- amostra com resultado reagente no teste de IFI terá seu resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Neste caso, é obrigatória a coleta de uma nova amostra para confirmação da positividade da primeira amostra.

2- amostra com resultado indeterminado ou negativo no teste de IFI, devem ser submetidas ao teste de WB.

Após a realização do teste WB, podemos encontrar as seguintes situações:

1- amostra reagente no teste de WB, terá seu resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Neste caso é obrigatória a coleta de uma nova amostra para confirmação da positividade da primeira amostra.

2- amostra indeterminada terá seu resultado definido como "Amostra indeterminada para HIV-1". Neste caso, deverá ser submetida à investigação de anticorpos anti HIV-2.

Recomenda-se, ainda, a coleta de nova amostra após 30 dias e a repetição de todo o conjunto de procedimentos sequenciados.

3- amostra negativa terá seu resultado definido como "Amostra negativa para HIV-1".

Neste caso, deverá ser submetida à investigação de anticorpos anti-HIV-2.

Recomenda-se, ainda, a coleta de nova amostra após 30 dias e a repetição de todo o conjunto de procedimentos sequenciados.

Convém observar que é obrigatória a coleta de uma segunda amostra e a repetição da etapa de triagem sorológica (etapa 1), sempre que uma amostra apresentar resultado definido como "Amostra positiva para HIV-1". Caso os resultados da testagem da segunda amostra sejam não reagentes ou indeterminados, deverão ser cumpridas todas as etapas do conjunto de procedimentos sequenciados.

Sempre que a primeira amostra for positiva ao teste de IFI ou ao teste WB e a segunda amostra for negativa aos testes de triagem, é preciso considerar a possibilidade de ter havido troca ou contaminação de amostras.

Deve-se ressaltar o fato de que todos os conjuntos de diagnósticos apresentam características intrínsecas que podem conduzir a resultados falsos.

Resultados falso-positivos podem ser decorrentes de problemas técnicos no procedimento do exame ou de alterações biológicas no indivíduo e que determinam reatividade, independentemente da condição investigada. Entre as causas de origem técnica, podemos citar: contaminação de ponteiras, contaminação da reação por soros vizinhos fortemente positivos, troca de amostras, ciclos repetidos de congelamento e descongelamento das amostras, pipetagens de baixa acurácia, inativação da amostra a 56°C e transporte ou armazenamento inadequado das amostras ou dos *Kits*.

Como possíveis causas de resultados falso-positivos, podemos mencionar, entre outras, as semelhanças antigênicas entre microrganismos, doenças autoimunes, infecções por outros vírus, uso de drogas endovenosas, aquisição de anticorpos anti-HIV passivamente.

É importante salientar que nem todos os casos de reações falso-positivas têm a sua causa definida ou podem ser evitados. Além disso, tais causas podem variar ou não, de acordo com os métodos utilizados.

Em relação aos resultados falso-negativos, é importante mencionar a sensibilidade do teste como uma das principais causas, em função das diferentes capacidades de detecção dos *Kits*, da ocorrência do período de janela imunológica ou da variabilidade na constituição antigênica dos conjuntos de diagnóstico. Entre as causas de ordem técnica como fatores que contribuem para o aparecimento de resultados falso-negativos, podemos citar: a troca da amostra, o uso de reagentes fora do prazo de validade, utilização de equipamentos desajustados, pipetagem incorreta e o transporte ou armazenamento inadequado das amostras ou dos *Kits*.

Finalmente, é importante enfatizar que mesmo com processamento adequado das amostras de sangue e a execução técnica correta de todas as etapas da reação sorológica no laboratório, é fundamental que o processo de aconselhamento, antes e depois do teste, seja feito de forma cuidadosa, para que o resultado do exame seja corretamente interpretado, tanto pelo profissional de saúde como pelo paciente, gerando atitudes que visem à promoção da saúde e/ou à prevenção da infecção pelo HIV nos indivíduos testados, conforme o diagnóstico obtido a partir da avaliação clínica laboratorial do paciente.

**ANEXO E – Descrição histopatológica baseada na classificação de Richart (1973).**

<p><b>GRAU DE NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)</b></p>	<p><b>Características da histopatologia</b></p>
<p><b>NIC I</b></p>	<p>Lesões que apresentam o terço basal do epitélio acometido por células com distúrbio de polarização e maturação.</p>
<p><b>NIC II</b></p>	<p>Lesões que apresentam dois terços basais do epitélio acometidos por células com pleomorfismo moderado, aumento da relação núcleo/citoplasma e cromatina granular.</p>
<p><b>NIC III</b></p>	<p>Lesões que apresentam mais de dois terços do epitélio acometidos por células com pleomorfismo acentuado, cromatina granulosa e nucleomegalia acentuada. Neste grupo são incluídas as lesões que acometem todo o epitélio, sem sinais de invasão.</p>

Fonte: (Richart, 1973)

**ANEXO F – Terminologia para a descrição histopatológica das lesões precursoras do câncer cervical, segundo a orientação de Wright et al. (1994), baseada na classificação proposta por Richart (1973).**

<b>WHO/ISGYP*</b>	<b>Terminologia do Sistema</b>
<p><b>Displasia leve (NIC I)</b>  <b>Cervicite com HPV</b></p>	<p><b>Lesão intraepitelial escamosa</b>  <b>(SIL de baixo grau = LSIL)</b></p>
<p><b>Displasia moderada (NIC II)</b>  <b>Displasia acentuada (NIC III)</b></p>	<p><b>Lesão intraepitelial escamosa</b>  <b>(SIL de alto grau = HSIL)</b></p>

\* World Health Organization and Internacional Society of Gynecological Pathologists.

Fonte: (Wright *et al.*, 1994)

## **APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido**

**Título do projeto:** “O papilomavírus humano como fator de risco para recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais em pacientes infectadas e não infectadas para o HIV, submetidas a conização por cirurgia de alta frequência .”

### **INTRODUÇÃO**

Será realizado estudo com peças cirúrgicas de colo uterino de mulheres infectadas ou não pelo HIV e que apresentaram alterações do colo uterino nas quais foi necessário realizar cirurgia. Algumas destas lesões voltaram a aparecer algum tempo após o acompanhamento dessas mulheres, e foi necessário realizar nova cirurgia. O nosso objetivo é verificar se o papilomavírus (HPV) (vírus que provoca verrugas genitais) foi responsável pela recidiva (retorno) dessas lesões.

Você esta sendo convidada a participar deste estudo. Antes de decidir pela sua participação, queremos informá-la sobre por meio deste Termo de Consentimento. Se você aceitar participar desse estudo, solicitamos que assine este documento. Você tem o direito de se recusar a participar a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento.

### **PORQUE ESTE ESTUDO ESTA SENDO REALIZADO?**

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença que destrói o sistema de defesa do organismo, deixando uma pessoa incapaz de lutar contra doenças que ameaçam a vida.

Pretendemos com este estudo verificar se o Papilomavírus Humano (HPV), que ocorre com mais frequência nas mulheres infectadas pelo HIV, atua como fator de risco na recidiva de lesão intra-epitelial cervical (retorno da lesão pré-cancerosa e cancerosa do colo do útero). E também queremos saber qual o tipo de HPV mais freqüente nas mulheres que apresentaram recidivas de lesões no colo do útero, no grupo de mulheres infectadas ou não pelo HIV. É importante saber se existem outros fatores que venham a aumentar ou não o risco de retorno de lesões pré cancerosas ou fatores que venham facilitar o diagnostico da doença.

Essas informações serão usadas para melhorar o acompanhamento e tratamento das pacientes com lesões do colo uterino, prevenindo o câncer, porque a maioria das mulheres portadoras do HIV (mais de 80%) são também portadoras do HPV (vírus que pode causar o câncer do colo uterino).

### **O QUE EU PRECISO FAZER?**

Se você decidir participar desse estudo, você deverá assinar este documento nos autorizando a analisar o material das biópsias e da cirurgia realizada no colo uterino , em qualquer época, visando sempre a avaliação de possíveis fatores que possam estar envolvidos no desenvolvimento do câncer do colo do utero. Lembre-se que a cirurgia já foi realizada anteriormente, e que você não será submetida a nenhum exame ou consulta ginecológica, ou qualquer outro procedimento cirúrgico. Todo este material está guardado em blocos de parafina (para conservá-lo melhor) no laboratório de anatomia patológica, o que é um procedimento de rotina.

### **QUANTAS MULHERES PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO?**

Estima-se a participação de aproximadamente 140 mulheres.

### **QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?**

O único risco é a quebra de sigilo, mas serão minimizados pelo armazenamento adequado dos resultados dos exames. Você não será submetida a nenhum procedimento médico ou a qualquer consulta ginecológica. Serão utilizadas peças cirúrgicas obtidas de procedimentos já realizados anteriormente em você, e que se encontram armazenadas (guardadas) no laboratório.

### **HÁ BENEFICIOS AO PARTICIPAR DESTE ESTUDO?**

Sim, as informações obtidas ajudarão os médicos a conhecerem mais sobre as lesões pré-cancerosas no colo uterino, em mulheres portadoras ou não do HIV. Pretende-se saber se há associação do vírus HPV e o risco de recidivas de lesões intra-epiteliais do colo (retorno das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo do útero) nas pacientes infectadas e não infectadas pelo HIV,

assim como o diagnóstico de possíveis fatores que possam surgir e estar envolvidos no desenvolvimento do câncer do colo uterino.

#### **CONFIDENCIALIDADE**

Serão feitos esforços no sentido de manter os prontuários médicos confidenciais, embora não se possa garantir absoluta confidencialidade. O seu prontuário médico poderá ser aberto, se exigido por lei. Os resultados dos seus exames serão mantidos em sigilo. Entretanto, esses prontuários poderão ser vistos por indivíduos que trabalham neste estudo e os resultados poderão ser publicados em revistas científicas. Você não será pessoalmente identificada em nenhuma publicação resultante da informação obtida neste estudo. As dúvidas éticas serão esclarecidas com os Comitês de ética envolvidos e as demais dúvidas com os pesquisadores.

#### **HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?**

Não.

#### **EU RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?**

Não, assim como não existe nenhuma remuneração para os pesquisadores.

#### **QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS POR PARTICIPAR DA PESQUISA?**

Sua participação na pesquisa é completamente voluntária. Você tem o direito de se recusar a participar a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento.

#### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu li este termo de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que eu posso sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

.....  
Nome da paciente

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

.....  
Assinatura da Paciente

---

Pesquisadora  
Claudia Teixeira da Costa Lodi  
Telefone: (31) 999521914  
e-mail: [claudiatclodi@gmail.com](mailto:claudiatclodi@gmail.com)

---

Orientador da Pesquisa  
Prof. Victor Hugo de Melo  
Telefones: (31) 992249909  
e-mail: [victormelo@terra.com.br](mailto:victormelo@terra.com.br)

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)**  
Av. Presidente Antônio Carlos, nº 6627– Pampulha  
Predio Reitoria- 2º andar anexo – CEP:31270-901  
Belo Horizonte – MG Telefone: (31) 3409-4592  
**e-mail: coep@prpq.ufmg.br**

**Comitê de Ética em Pesquisa da SMSA-PBH**  
R Frederico Bracher Junior 103 – 3º andar / sl2  
Padre Eustáquio - Belo Horizonte - CEP: 30720-000  
Telefone: (31)3277-5309 - **e-mail: coep@pbh.gov.br**

## APÊNDICE B – Estatísticas referentes aos valores de CD4+ e Carga viral HIV

CD4+

<i>Mean</i>	304,00
<i>Median</i>	280,50
<i>Std. Deviation</i>	174,489
<i>Variance</i>	30446,329
<i>Range</i>	784
<i>Minimum</i>	23
<i>Maximum</i>	807

	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Valid Percent</i>	<i>Cumulative Percent</i>
CD4+ < 200	23	31,1	31,1	31,1
>200	51	68,9	68,9	100,0
Total	74	100,0	100,0	

Log Carga viral

<i>Mean</i>	3,3566
<i>Median</i>	3,6950
<i>Std. Deviation</i>	1,78391
<i>Variance</i>	3,182
<i>Minimum</i>	,00
<i>Maximum</i>	6,92

	<i>Frequency</i>	<i>Percent</i>	<i>Valid Percent</i>	<i>Cumulative Percent</i>
Log CV > 0,3	65	87,8	87,8	87,8
< = 0,3	9	12,2	12,2	100,0
Total	74	100,0	100,0	

## APÊNDICE C – Análises estatísticas de interação

1- Variável colposcopia foi retirada do modelo de regressão em relação à recidiva, por apresentar interação com citologia ( $p=0,027$ ).

		COLPOSCOPIACOD		Total
		GRAU II	GRAU I	
CITO RECOD	ALTERADA	63	37	100
	NORMAL	18	24	42
Total		81	61	142

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
<i>Pearson Chi-Square</i>	4,897 <sup>a</sup>	1	<b>,027</b>		
<i>Continuity Correction<sup>b</sup></i>	4,110	1	,043		
<i>Likelihood Ratio</i>	4,872	1	,027		
<i>Fisher's Exact Test</i>				,040	,022
<i>Linear-by-Linear Association</i>	4,863	1	,027		
<i>N of Valid Cases</i>	142				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 18,04.

b. Computed only for a 2x2 table

## APÊNDICE D – Análises estatística incluindo variável gene *TIMP3*

Unweighted Cases <sup>a</sup>		N	Percent
Selected Cases	Included in Analysis	82	55,8
	Missing Cases	65	44,2
	Total	147	100,0
Unselected Cases		0	,0
Total		147	100,0

### Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	4,183	8	,840
2	4,655	6	,589
3	2,741	4	,602
4	,035	2	,983
5	,000	1	1,000
6	,000	0	.

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	1,723	,945	3,324	1	,068	5,603	,879	35,728
MARGEMCAFCOD	,560	,736	,579	1	,447	1,750	,414	7,407
HIV	,756	,692	1,194	1	,274	2,130	,549	8,269
CDHIRBIN	-,094	,703	,018	1	,894	,911	,230	3,610
MGMTRBIN	-,639	,709	,811	1	,368	,528	,131	2,121
TIMP3RBIN	-,822	,980	,703	1	,402	,440	,064	2,999
Constant	-,058	1,043	,003	1	,956	,944		
Step 2 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	1,707	,936	3,325	1	,068	5,512	,880	34,526
MARGEMCAFCOD	,566	,733	,596	1	,440	1,761	,419	7,408
HIV	,754	,692	1,188	1	,276	2,125	,548	8,244
MGMTRBIN	-,640	,707	,818	1	,366	,528	,132	2,109
TIMP3RBIN	-,861	,933	,852	1	,356	,423	,068	2,631
Constant	-,077	1,033	,006	1	,941	,926		
Step 3 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	1,772	,926	3,664	1	,056	5,886	,958	36,141
HIV	,724	,688	1,108	1	,293	2,062	,536	7,940
MGMTRBIN	-,540	,685	,621	1	,431	,583	,152	2,232
TIMP3RBIN	-,895	,937	,912	1	,339	,409	,065	2,564
Constant	,239	,943	,064	1	,800	1,270		
Step 4 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	1,816	,924	3,868	1	,049	6,149	1,006	37,575
HIV	,664	,682	,947	1	,330	1,943	,510	7,399
TIMP3RBIN	-,961	,934	1,058	1	,304	,382	,061	2,387
Constant	-,108	,829	,017	1	,896	,897		
Step 5 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	2,031	,899	5,107	1	,024	7,625	1,309	44,402
TIMP3RBIN	-1,115	,917	1,478	1	,224	,328	,054	1,979
Constant	,000	,816	,000	1	1,000	1,000		
Step 6 <sup>a</sup>								
OCUGLANDCOD	1,887	,884	4,555	1	,033	6,600	1,167	37,341
Constant	,000	,816	,000	1	1,000	1,000		

a. Variable(s) entered on step 1: OCUGLANDCOD, MARGEMCAFCOD, HIV, CDHIRBIN, MGMTRBIN, TIMP3RBIN.