



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

CIDÁLIA LUÍSA GOMES PEIXOTO

***PAPEL DO HPV E COFATORES NO CANCRO DO
COLO DO ÚTERO***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROF. DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO
DIAS**

DRA. MARIANA VIDE TAVARES

MARÇO/2016

Índice

Resumo.....	2
Abstract	4
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	6
1- Introdução	8
2- Materiais e Métodos.....	10
3- HPV.....	11
a) Estrutura	11
b) Ciclo de vida.....	13
c) Classificação citológica e histológica das lesões pré-malignas	16
d) Carcinogénese cervical.....	18
e) Resposta imune	22
4- Cofatores do HPV	25
a) Tabaco	25
b) Contraceptivos hormonais.....	31
c) Gravidez e Paridade	37
d) Imunossupressão	39
e) Coinfeção com outras IST.....	44
f) Suscetibilidade genética	49
5- Discussão e Conclusão.....	51
Agradecimentos.....	54
Referências bibliográficas	55

Resumo

O papel do Vírus do Papiloma Humano (HPV) na etiopatogenia do cancro do colo do útero (CCU) está bem estabelecido. Sabe-se que a infeção por este vírus é necessária mas não suficiente por si só, existindo cofatores na carcinogénese cervical. Este artigo consiste numa revisão da literatura médica sobre o HPV e os seus cofatores. Os principais objetivos foram compreender a estrutura e o ciclo de vida do HPV; descrever o seu papel na carcinogénese cervical; descrever os cofatores da infeção por HPV, o seu peso no desenvolvimento do CCU e os mecanismos pelos quais influenciam a progressão da infeção pelo HPV para cancro.

O tabaco é um cofator bem estabelecido, sabendo-se que interfere em todas as fases da carcinogénese. Contudo, o seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, supondo-se que tenha um efeito simultaneamente imunodepressor e genotóxico. O uso de contraceção hormonal combinada por via oral, principalmente se superior a 5 anos, parece aumentar o risco de CCU e a suspensão do contraceptivo tem um efeito benéfico. Este cofator aumenta a exposição da zona de transição e influencia a imunidade local. O papel da gravidez na progressão das lesões parece ser mínimo. Todavia, parece existir um aumento do risco de CCU com a multiparidade. As alterações hormonais e imunológicas próprias da gravidez bem como o trauma do colo do útero aquando do parto podem estar envolvidas no mecanismo. As mulheres com imunossupressão, quer iatrogénica, quer por patologias autoimunes ou pelo Vírus da Imunodeficiência Humana/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (VIH/SIDA) têm também um risco aumentado de lesões pré-malignas e CCU. Nestas doentes poderá haver uma infeção latente que se torna ativa ou, por outro lado, comprometimento da capacidade daquelas eliminarem uma nova infeção. A coinfeção por outros agentes sexualmente transmissíveis, como a *Chlamydia trachomatis* e o Herpes simplex vírus 2, aumentará o risco uma vez que promovem a inflamação crónica do colo do útero. Por último, os cofatores genéticos ainda não são bem conhecidos, supondo-se que terão um papel na imunidade.

Em suma, existem cofatores da infecção por HPV com um papel preponderante no aparecimento de cancro do colo do útero. O conhecimento destes cofatores permitirá compreender melhor a evolução da infecção pelo HPV numa determinada mulher, possibilitando uma vigilância mais atenta e direcionada.

Palavras-chave: cancro do colo do útero; HPV; cofatores; carcinogénese; coinfeção; imunossupressão; paridade; tabaco; contraceção.

Abstract

The role of Human papillomavirus (HPV) in the etiopathogeny of cervical cancer (CC) is well established. It is known that infection by this virus is necessary but not sufficient. There are HPV cofactors in cervical carcinogenesis. This article consists on a medical literature review on HPV and its cofactors. The main objectives were to understand the structure and life cycle of HPV; describe its role in cervical carcinogenesis; describe HPV infection cofactors, its weight in the development of CC and the mechanisms by which they influence the progression of HPV infection to cancer.

Tobacco is a well-established cofactor. It interferes in all stages of carcinogenesis. However, the mechanism of action is still not well known, assuming that has an immunosuppressant and genotoxic effect simultaneously. The use of combined hormonal contraception orally, especially if more than 5 years, appears to increase the risk of CC and the suspension of the contraceptive has a beneficial effect. This cofactor increases the exposure of the transition zone and influences local immunity. The role of pregnancy on progression of lesions appears to be minimal. However it seems to occur an increased risk of CC with multiparous. The hormonal and immunological changes of pregnancy and cervical trauma during birth may be involved in the mechanism. Women with immunosuppression by iatrogeny, autoimmune diseases or Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS) also have a risk of premalignant lesions and CC. In these patients there may be a latent infection which becomes active or, on the other hand, the capacity of eliminating a new infection is compromised. Coinfection with other sexually transmitted agents, such as *Chlamydia trachomatis* and herpes simplex virus 2, will also increase the risk, since these infections will promote chronic inflammation of the cervix. Finally, there are genetic cofactors, however, aren't well known. They probably have a role in immunity.

In summary, there are HPV infection cofactors and they have a role in genesis of cervical cancer. The knowledge of these cofactors may allow better understand of the evolution of HPV infection in a given woman, providing a closer and targeted surveillance.

Keywords: cervical cancer; HPV; cofactors; carcinogenesis; coinfection; immunosuppression; parity; tobacco; contraception

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ASC-US: Atipia de Significado Indeterminado

ATM: ataxia telangiectasia

CC: *Cervical cancer*

CCU: Cancro do colo do útero

CD: *Cluster of differentiation*

CHC: Contraceção hormonal combinada

CIN: Neoplasia Intraepitelial Cervical

CIS: Carcinoma *in situ*

CT: *Chlamydia trachomatis*

DGS: Direção Geral de Saúde

DII: Doença Inflamatória Intestinal

E: *Early*

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

EPIC: *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*

FANCA: *Fanconi anemia complementation group A*

HAART: *Highly active antirretroviral therapy*

HLA: Antígeno leucocitário humano

HPV: Vírus do papiloma humano

HSIL: Lesão Intraepitelial de alto grau

HSV2: Herpes simplex vírus 2

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IFN: Interferão

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IST: Infecção sexualmente transmissível

L: *Late*

LAST: *Lower Anogenital Squamous Terminology*

LCR: *Long Control Region*

LES: Lúpus Eritematoso Sistémico

LSIL: Lesão Intraepitelial de baixo grau

MHC: Complexo *major* de histocompatibilidade

NF- κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NILM: Negativo para Lesão Intraepitelial ou Neoplasia Maligna

NK: *Natural Killer cells*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PD-1: *Programmed cell death protein 1*

RR: Risco Relativo

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNP: Polimorfismo de nucleótido único

TARV: Terapêutica antirretroviral

THS: Terapia hormonal de substituição

TNF: Fator de necrose tumoral

TRL: *Toll-like receptor*

TV: *Trichomonas vaginalis*

VB: Vaginose bacteriana

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana

1- Introdução

Segundo o projeto GLOBOCAN, o cancro do colo do útero (CCU) é o 4º cancro mais frequente em mulheres, com 528 000 novos casos em 2012, representando 7,5% de todas as mortes por cancro no sexo feminino. Em 2012, morreram cerca de 266 000 mulheres vítimas deste cancro. Cerca de 87% dos casos ocorre nos países em desenvolvimento. (1) Em Portugal, o CCU tem uma taxa de incidência de 15,5% (2009), com uma mortalidade de 3,9/100 000 mulheres (2012). (2)

Um estudo conduzido em 22 países mostrou que 99,7% em 1000 casos confirmados histologicamente de CCU mostraram-se positivos para ADN do HPV. (3,4) Quase todos os casos de CCU são causados pelos Vírus do Papiloma Humano (HPV) de alto risco. (5)

Atualmente estão identificados cerca de 200 subtipos de HPV que infetam tanto pele como mucosas. (6) Os subtipos 16 e 18 causam 70% dos CCU. (7)

A infeção genital por HPV é a infeção sexualmente transmissível mais comum, com uma taxa de transmissão de homem para mulher *per coito* entre os 40 a 80%. (8) No entanto, não é necessário haver penetração sexual para a transmissão do vírus, sendo esta possível através do contato pele-a-pele genital. (9) Aproximadamente 80% das mulheres será exposta ao HPV durante a sua vida. A maioria das infeções é autolimitada, desaparecendo espontaneamente após alguns meses. (5) Cerca de 70% resolve dentro de um ano e mais de 90% resolvem em 2 anos. (8,10) Quanto mais longa for a infeção, maior a probabilidade de ela persistir. (11)

A persistência da infeção cervical por HPV de alto risco é necessária para o desenvolvimento de CCU mas não suficiente (5,8,10). A persistência a longo prazo de HPV de alto risco não resulta sempre em lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). (8) A maioria das mulheres com infeção pelo HPV nunca irá desenvolver doença, o que significa que existem outros fatores envolvidos, quer genéticos, quer ambientais, quer imunológicos. (10)

O desenvolvimento de CCU ocorre em cerca de 15 a 20 anos em algumas mulheres, enquanto noutras pode demorar apenas 5 a 10 anos (9), indicando que existem cofatores envolvidos, juntamente com o HPV de alto risco para induzir carcinogénese cervical.

Outros cofatores são necessários para a progressão da infeção por HPV de alto risco para CCU, tais como a suscetibilidade genética, a variabilidade do genoma do hospedeiro, a variabilidade dos subtipos HPV, múltiplas infeções por HPV, a imunossupressão quer iatrogénica, quer pela coinfeção com o VIH e outros agentes sexualmente transmissíveis como, por exemplo, a *Chlamydia trachomatis*, o tabagismo, o uso a longo prazo de contraceptivos hormonais e a multiparidade. (5,8,10,12,13) Assim, é necessário entender até que ponto os cofatores intervêm na carcinogénese cervical.

Cerca de 85% dos CCU são carcinomas espinho-celulares com origem no exocolo. Estes são mais bem entendidos (10,11) e irão ser o foco do presente trabalho.

Dada a elevada prevalência da infeção pelo HPV, afigura-se da maior relevância fazer uma revisão atual de como este vírus e os seus cofatores influenciam a carcinogénese cervical. Este artigo de revisão tem como objetivos compreender a estrutura e o ciclo de vida do HPV; descrever qual o seu papel na carcinogénese cervical; descrever os cofatores da infeção por HPV, o seu peso no desenvolvimento do CCU e os mecanismos pelos quais influenciam a progressão da infeção pelo HPV para cancro.

2- Materiais e Métodos

Para a elaboração do presente artigo de revisão foi realizada uma pesquisa de artigos científicos utilizando a base de dados PubMed. Para a pesquisa utilizaram-se os termos *HPV carcinogenesis*, *HPV infection*, *cervical cancer*, *HPV cofactors*. Foram selecionados artigos originais e de revisão relevantes publicados entre 2005 e 2016 em língua inglesa. Foram também consultados os artigos referenciados nos artigos primeiramente selecionados. Consultou-se ainda o *website* da OMS e da DGS.

3- HPV

a) Estrutura

O HPV é um vírus icosaedro de 55 nm de diâmetro, sem envelope, composto por ADN de dupla cadeia, com genoma de aproximadamente 8000 bases, com 3 regiões: a região precoce (E – *early*) que é expressa na fase inicial da infecção com os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, regulando as fases do ciclo viral e a replicação viral; a tardia (L – *late*), expressa na fase tardia de infecção e constituída por L1 e L2 que codificam, respetivamente, as proteínas *major* e *minor* do cápside; e uma região não-codificante a região de controlo LCR (*long control region*) que se situa entre as anteriores e que controla a transcrição dos genes e a replicação do HPV. (5,10,11,13)

Classifica-se filogeneticamente em cinco géneros: alfa, beta, gama, mu e nu, que depois se dividem em várias espécies.(14) Os alfa papilomavirus infetam o epitélio das mucosas e dividem-se em HPV de alto risco e HPV de baixo risco consoante a sua associação com o cancro. Enquanto os primeiros estão na etiologia de cancros anogenitais e orofaríngeos, os segundos podem causar lesões benignas. (5,14)

Os genes E1 e E2 codificam proteínas que controlam a transcrição e a replicação do ADN viral, regulando a função dos genes E6 e E7. Assim, na ausência ou perda de função dos genes E1 e E2 ocorre a desregulação de E6 e E7. (10,13) No entanto um estudo recente mostrou que há replicação do ADN viral mesmo sem o E1 e E2. (10)

O gene E1 codifica uma enzima com atividade de ADN helicase que faz o reconhecimento da origem da replicação do ADN. (14,15) Quando ligada à origem viral de replicação esta enzima recruta os componentes celulares necessários para a replicação de ADN celular de modo a conduzir a replicação do ADN viral. (15) E2 codifica uma proteína com 3 funções *major* no ciclo de vida viral. Em primeiro lugar, as proteínas E2 são fatores de transcrição virais, regulando os níveis de expressão dos outros genes virais e, dependendo do

sítio de ligação ao LCR, atua como repressor ou ativador de transcrição. (10,14,15) Outra função deste gene é recrutar o E1 de modo a facilitar a formação de complexos E1 no ADN viral e reforçar a replicação deste.(14,15) Por último, tem um papel fundamental na transferência do genoma viral para as células filhas durante a divisão da célula hospedeira. (15)

E4 codifica uma proteína cuja função não está esclarecida, mas pensa-se que auxilie na amplificação do ADN viral e que possa controlar a libertação do vírus da célula.(13,15)

E5 codifica uma oncoproteína hidrofóbica cuja atividade ainda é pouco conhecida mas que contribui para a imortalização da célula.(13,15) Sabe-se que promove a amplificação do genoma, aumentando a atividade do EGFR. Induz também a perda da expressão de superfície do MHC-I nas células epiteliais, levando à evasão da vigilância imune na fase precoce de infeção. (10,13–15)

E6 codifica uma oncoproteína cuja função mais bem conhecida é a degradação da proteína supressora tumoral p53. (5,10,13–15) Em células normais a p53 permite reparar ADN danificado enquanto que nas células infetadas por HPV de alto risco o E6 recruta a ligase celular ubiquitina UBE3A (E6AP) para um complexo ternário com o p53, resultando na degradação do p53 pela via de ubiquitinização conduzindo ao seu rápido *turnover*, permitindo que a célula passe o ponto de controlo celular negativo. (5,10,13,14) Para além disso, E6 ativa a expressão do hTert, uma subunidade catalítica da telomerase, que se encontra na maioria dos cancros. (14)

O gene E7 codifica uma oncoproteína que se liga com grande afinidade às membranas das proteínas da família Rb (proteínas supressoras do retinoblastoma), levando à sua degradação.(13–15) Assim, atua a nível da via reguladora do ciclo celular controlada pela proteína supressora tumoral pRb e pelas proteínas relacionadas p107 e p130. (15) Isto permite que a célula progrida no ciclo celular na ausência de sinais mitogénicos normais. Devido a estes mecanismos de bloqueio, ocorre proliferação celular não controlada, permitindo ultrapassar os pontos de controlo do ciclo celular em G1 e G2 (13) e manter a célula em estado de fase *S-like*

na diferenciação dos queratinócitos. (15) Esta oncoproteína ativa também a via ATM. A via ATM nas células normais permite reparar danos nas cadeias duplas de ADN, enquanto nas células infetadas permite a amplificação do genoma do HPV em células diferenciadas. A ativação da via ATM não é necessária para a manutenção estável dos episomas nas células basais, mas é fundamental na amplificação do genoma em células diferenciadas.(14)

A oncoproteína E7 é coexpressa com a E6 em HPV's de alto risco e atuam sinergicamente promovendo a carcinogénese.(14) Permitem criar um ambiente apropriado para a replicação de ADN viral através da superação dos processos apoptóticos celulares.(15) Assim, no ciclo de vida estas duas proteínas mantêm a diferenciação celular ativa no ciclo da célula e atuam para promover a progressão maligna. (14)

L1 e L2 são genes tardios que codificam proteínas estruturais para a formação completa das partículas do vírus, sendo responsáveis pela formação da cápside viral. (5,10,13,15)

O LCR regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7 através dos fatores de transcrição do vírus e das células do hospedeiro. (10)

b) Ciclo de vida

O colo do útero corresponde ao terço inferior do útero, podendo ser topologicamente visto como um anel de epitélio de duas dimensões. (12)

A junção escamo-colunar é uma linha onde o epitélio estratificado escamoso não queratinizado do exocolo encontra-se com o epitélio colunar do endocolo. A sua localização em relação ao orifício externo varia com a idade, estado menstrual, o uso de contraceptivos hormonais e a gravidez. Na infância, perimenarca, após a puberdade e no início do período reprodutivo a localização desta junção é semelhante à da vida intra-uterina, sendo denominada de junção escamo-colunar original. Na infância e perimenarca a junção está localizada no orifício cervical externo ou próximo deste. Durante a puberdade e o período reprodutivo ocorre

o crescimento do colo do útero sob a influência dos estrogénios. Adicionalmente, o canal endocervical alonga-se, levando ao surgimento do ectrópion. Este corresponde à eversão do epitélio colunar do endocolo sobre o exocolo, quando o colo do útero cresce rapidamente através da influência do estrogénio depois da menarca e durante a gravidez. A exposição do epitélio colunar à acidez da vagina permite o aparecimento de metaplasia escamosa. Este processo inicia-se na junção escamo-colunar e segue em direção ao orifício cervical externo de forma centrípeta. Deste modo vai surgir uma nova junção escamo-colunar entre o epitélio metaplásico e epitélio colunar evertido. Esta junção vai avançando progressivamente no exocolo em direção ao orifício cervical externo desde a idade reprodutiva até à perimenopausa, encontrando-se a distâncias variáveis como resultado da formação progressiva de epitélio metaplásico escamoso. A partir da perimenopausa o colo do útero diminui e a junção vai em direção ao canal endocervical. (16)

A zona de transformação é a área de tecido metaplásico fisiológica (metaplasia escamosa) onde o epitélio estratificado escamoso do exocolo encontra e substitui o epitélio glandular colunar do endocolo, sendo especialmente suscetível a agentes carcinogénicos. Nas mulheres pré-menopausa esta zona localiza-se no exocolo, mudando de posição na pós-menopausa, onde passa a situar-se mais próximo do canal endocervical. Nesta zona existem células estaminais para apoiar o *turnover* contínuo de ambos os tipos de células. Uma população de células desta zona com características morfológicas e moleculares específicas foi descrita recentemente como as células que poderão estar na origem da maioria dos CCU e lesões pré-malignas.(8,11,12,16)

O HPV é especificamente epiteliotrófico e o seu ciclo de vida ocorre nas células de epitélios escamosos estratificados. O HPV infeta as células da camada basal do epitélio estratificado escamoso, os alvos celulares do vírus, que foram expostas por microabrasão ou trauma.(8,14,15). Os mecanismos para a entrada ainda não são totalmente conhecidos.

Posteriormente, inicia-se a replicação do ADN viral, a qual se localiza e é sustentada pela célula do hospedeiro. (15) Nas células basais infetadas, o genoma do HPV é mantido em elementos extracromossómicos, os episomas, que se replicam em fase S em sincronia com a replicação celular. Depois da entrada na camada basal, o número de cópias do genoma viral em forma de episomas rapidamente aumenta, em média, para cerca de 50-100 cópias por célula. (14) Dentro destas células, apenas os produtos dos genes virais precoces (E) são expressos, sendo esta, referida como a fase não produtiva da infeção. A infeção pelo HPV pode persistir ao longo de muitos anos. Para o desenvolvimento de cancro é necessário a persistência de uma infeção por um HPV de alto risco. Esta manutenção requer que o genoma viral seja mantido ao longo de várias divisões celulares através de mecanismos que ainda são pouco claros. (15)

A fase produtiva do ciclo de vida começa quando as células filhas derivadas de células basais infetadas iniciam a sua diferenciação.(15) Pressupõe-se que os HPV de alto risco estimulam a proliferação da camada basal e das células parabasais através da degradação da pRb e p107. (14) Durante a diferenciação das células parabasais, o vírus atrasa o programa de diferenciação terminal das células e redireciona a capacidade de replicação de ADN da célula, induzindo um processo de amplificação que permite um nível elevado de replicação do genoma viral. Este processo ocorre em simultâneo com expressão dos genes virais tardios (L) necessários para a síntese das proteínas da cápside, seguido de montagem e libertação do virião. (5,14,15) As células do hospedeiro infetadas dividem-se e espalham-se lateralmente, causando infeção das camadas parabasais. (10)

A expressão dos oncogenes E6 e E7 é fortemente regulada, com expressão em elevado nível apenas nas células pós-mitóticas parabasais. Nesta fase, como referido anteriormente, os oncogenes virais induzem a reentrada na fase S do ciclo celular e ativam os mecanismos de replicação necessária para a amplificação do genoma viral. (5)

A integração do genoma do HPV de alto risco é geralmente considerada um evento necessário na progressão para CCU, correlacionando-se o aumento da presença de ADN viral integrado com a progressão da doença. (5) O genoma viral encontra-se integrado nos cromossomas do hospedeiro, causando o aumento da expressão e estabilidade dos oncogenes E6 e E7, de modo a conservar apenas a expressão destes genes. Esta integração conduz à perda da expressão de E1 e E2. Como a proteína E2 regula negativamente a expressão de E6 e E7, a perda desta proteína durante a integração provoca o aumento da transcrição das oncoproteínas virais E6 e E7 que contribuem para a transformação maligna. O ADN do HPV imortaliza os queratinócitos do hospedeiro através das interações entre os oncogenes E6 e E7, inibindo a apoptose. (5,10,14) Assim, a integração do genoma de HPV resulta na expressão aumentada e desregulada dos oncogenes virais E6 e E7. (5)

Após a infeção e integração de ADN viral no genoma do hospedeiro, o ciclo de vida do HPV progride de forma sinérgica com a maturação da célula epitelial. (17)

Em suma, o ciclo de vida do HPV depende da diferenciação da célula hospedeira infetada e da replicação celular de proteínas. A replicação viral depende maioritariamente de proteínas celulares tanto para a manutenção estável de genomas virais em células indiferenciadas, bem como a replicação produtiva ou amplificação em células diferenciadas. O genoma do HPV frequentemente integra o genoma do hospedeiro durante a progressão maligna mantendo apenas a expressão de E6 e E7. (12)

c) Classificação citológica e histológica das lesões pré-malignas

Existem várias nomenclaturas para classificar o modelo da história natural da infeção e dos precursores do CCU.

Do ponto de vista citológico, inicialmente surgiu a classificação Papanicolaou (I, II, III, IV, V) que fornecia uma previsão da probabilidade de carcinoma invasivo subjacente. Em 1990

foi criado o Sistema Bethesda que classifica em negativa para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna (NILM), atipia de significado indeterminado (ASC-US), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma espinho-celular (12).

Histologicamente, utilizou-se primeiro a nomenclatura por displasia do epitélio escamoso, classificando-se em displasia ligeira, moderada, grave e carcinoma *in situ*. Posteriormente, Richart propôs a classificação das Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (CIN). CIN1 corresponde a displasia ligeira e, mais tarde, incluiu a evidência citológica de infecção por HPV (atipia coilocítica) sendo patognomónico de infecção por HPV (8); CIN2 substituiu displasia moderada; CIN3 engloba displasia grave e carcinoma *in situ*. Os fatores de risco e a distribuição dos genótipos do HPV no CIN2 e CIN3 são diferentes, e o CIN2 tem maior probabilidade de regredir espontaneamente em comparação com o CIN3. (12)

As lesões CIN 1 regredem espontaneamente em 57% dos casos, com apenas 11% a progredir para CIN3. (5,18) O comportamento biológico do CIN2 ainda não é bem entendido, mas sabe-se que 43% dos casos regredem. Já o CIN3, que é um precursor imediato de cancro, também pode regredir em 32% dos casos, mas os que persistem, normalmente durante uma ou duas décadas, progredem para a cancro invasivo em 12% dos casos. (8,18)

Estima-se que o tempo médio entre a infecção por HPV de alto risco e o aparecimento de CIN3 é muito mais curto que as típicas décadas necessárias entre uma lesão CIN3 detetável e o cancro invasivo, no entanto existe uma marcada heterogeneidade individual. (8,11)

Em 2012 surgiu a nomenclatura LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*) que se baseia na marcação p16 para classificar o CIN2. O p16 é um gene supressor tumoral celular utilizado como biomarcador de disrupção do HPV na via do Rb. O CIN2 p16-positivo juntamente com o CIN3 formam as lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) que representam o precursor imediato do CCU. O CIN2 p16-negativo em conjunto com CIN1 englobam as

lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) que representam um sinal histológico de infecção pelo HPV.(11,12)

d) Carcinogênese cervical

Os estádios na carcinogênese cervical incluem a infecção aguda pelo HPV; a persistência, apesar da *clearance* do vírus, ligada ao desenvolvimento de uma lesão precursora de alto-grau; e a invasão. Estes estádios são necessários, sendo o CCU virtualmente impossível na ausência de infecção sexualmente transmitida pelo HPV.(11,12)

O primeiro estágio é a infecção aguda pelo HPV, sendo um estágio precursor necessário para o CCU.(12) A infecção anogenital é transmitida principalmente por contato pele-a-pele e mucosa-com-mucosa. (7)

Os fatores comportamentais que influenciam o risco de infecção são aqueles que aumentam as hipóteses de encontrar um parceiro infetado. (12) Assim, os fatores de risco para a infecção por HPV estão relacionados com a atividade sexual, tais como a idade jovem de início, número de parceiros, parceiros sexuais recentes e relações sexuais com parceiros que têm outros parceiros quer sejam homens ou mulheres. (8,19) Pessoas com múltiplos parceiros sexuais durante a vida têm um risco de infecção pelo HPV de 20,1%, enquanto as pessoas com um parceiro sexual só têm 7% de risco. (13)

Uma mulher pode ter várias infecções ao mesmo tempo ou em tempos diferentes.(11) Devido a sua maneira de transmissão, os subtipos de HPV tendem a ser transmitidos em conjunto, resultando em cerca de 20-30% de infecções com vários subtipos de HPV. (7)

A prevalência da infecção cervical por HPV depende da idade, sendo maior entre os 15 e 25 anos. Esta está provavelmente relacionada com o comportamento sexual nestas idades (a idade da primeira relação sexual e o número de parceiros sexuais, por exemplo) que vai aumentar a probabilidade de exposição, com a ausência de respostas imunes adquiridas e com

a existência de áreas relativamente maiores do epitélio com metaplasia escamosa. Posteriormente, a prevalência diminui com a idade provavelmente devido a uma menor exposição ao HPV, à natureza autolimitada da maioria das infecções e à resistência a reinfeções. (19) Contudo, existem diferenças na idade da prevalência relacionadas com a região em que a mulher vive que ainda não são bem compreendidas. Em algumas regiões é representada por uma curva em forma de U: alta prevalência em idades jovens seguida de uma diminuição e, posteriormente, de um aumento da prevalência em idades mais avançadas. Noutros casos, aumenta em idades jovens e mantém-se constante com a idade. (8)

Grande parte das infecções pelo HPV detetadas por métodos moleculares tornam-se indetetáveis após alguns meses. Numa minoria das infecções pode detetar-se uma alteração citológica como ASC-US ou LSIL. A *clearance* da infeção associada com LSIL é frequentemente rápida, com mais de metade das infeções resolvidas dentro de um ano e 90% das infeções dentro de aproximadamente 2 anos após a aquisição. Geralmente as HSIL são diagnosticadas vários anos após a aquisição do HPV. Estas tipicamente crescem lateralmente à volta da circunferência da zona de transformação, demorando até 2 décadas a se tornarem invasivas. (12)

A maioria das infeções por HPV é benigna e resolve-se por si só, no entanto uma pequena percentagem de mulheres desenvolve infeção persistente. A média de duração da infeção varia consoante o genótipo do HPV por razões que ainda não estão esclarecidas. (8,10) Cofatores etiológicos para a persistência e progressão para lesão de alto grau incluem fatores virais e fatores comportamentais e genéticos do hospedeiro.(4,19)

Na carcinogénese, o precursor subsequente e necessário à infeção, como já foi referido, é uma lesão de alto grau associada a persistência viral. (12) Os HPV de alto risco infetam principalmente jovens mulheres e homens sexualmente ativos, geralmente resolvendo através da resposta imune, no entanto pode persistir, com o genoma do HPV integrando os

cromossomas do hospedeiro e expressando os genes E6 e E7. A expressão das proteínas virais E6 e E7 é essencial para o desenvolvimento de CCU. (14)

Sabemos que, tipicamente, demora vários anos desde a infecção pelo HPV, mesmo se esta persistir, até causar CCU. O pico de aquisição da infecção é na adolescência e jovens adultos, já o pico de HSIL ocorre entre os 30-45 (20) e o pico de CCU é entre os 45-60 anos. (12)

O tabaco, o uso a longo prazo de contraceptivos hormonais e a multiparidade são cofatores com risco moderado para CCU. (5,8) São cofatores comportamentais que duplicam, aproximadamente, o risco de HSIL entre as mulheres infetadas pelo HPV, não obstante ainda não se encontrar esclarecido o mecanismo desta associação. Outros cofatores para a progressão da HSIL incluem a coinfeção com outros agentes sexualmente transmissíveis, que promovem a inflamação cervical crónica, e a imunossupressão. Os fatores genéticos do hospedeiro influenciando o controlo da infecção certamente existem mas são pouco conhecidos. (12)

A história natural da HSIL em termos de fatores de risco não é bem conhecida. O fator de risco chave é a persistência viral. Uma minoria das HSIL tornam-se invasivas durante a vida dos pacientes. Os fatores associados com a invasão continuam sem ser entendidos, bem como os mecanismos levam a contenção ou até à regressão da HSIL, apesar de se presumir que fatores imunológicos tenham um papel importante. Existem poucos fatores de risco identificados para a transição entre HSIL e CCU, para além da idade. Foram identificados cofatores de força moderada que aumentam o risco de HSIL e de CCU mas que não são determinantes críticos mormente o tabagismo, o uso a longo prazo de contraceptivos, a multiparidade e coinfeção com outros agentes. (11,12) Estima-se que existe um risco de invasão de 20-30% durante 5-10 anos.(7)

No entanto, o genótipo do HPV é o melhor preditor do risco de persistência da doença, logo é o melhor a prever o risco de HSIL uma vez que a progressão varia muito consoante o subtipo. (12) Se uma mulher de qualquer idade é negativa para um HPV de alto risco tem baixo

risco para CIN ou CCU nos próximos 5 anos. (8) Outros cofatores são a coinfeção por múltiplos subtipos.(10) Pensa-se que a coinfeção por múltiplos subtipos oncogénicos de HPV possa influenciar a persistência e a história natural da infeção pelo HPV.(17)

Os subtipos carcinogénicos já comprovadamente identificados como tal são o HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Quando presentes, causam alterações citológicas em 30% dos casos e quase todas as lesões severas. Outros subtipos de HPV são possíveis carcinogénicos, podendo representar uma pequena fração de casos de CCU. (11,12) A maioria das mulheres está em risco para infeções por HPV de alto risco. (8)

O subtipo mais importante de HPV é o HPV16 que é responsável por apenas 20% das infeções mas causa 40% das HSIL e metade dos CCU. (11,12) Sabe-se que o HPV 16 infeta os queratinócitos, tornando-os incapazes de se diferenciar como células normais. Estas células apresentam semelhanças com as lesões cervicais pré-malignas, apoiando a associação entre a infeção por HPV de alto risco e lesões pré-malignas. Os queratinócitos descamativos do epitélio estratificado infetado libertam os HPV. (13)

A distribuição na Europa do subtipo de HPV em lesões CIN de alto grau e CCU foi conhecida através do estudo HERACLES e SCALE, nos quais Portugal participou. Na Europa os subtipos mais comuns em mulheres CIN de alto grau são o 16, 33, 31, 52 e 18 com, respetivamente, 59,9%; 10,5%; 9,0%; 3,9% e 3,6% enquanto que no CCU os subtipos são 16, 18, 45, 33 e 31 com, respetivamente, 63,3%; 15,2%; 5,3%; 4,6%; 3,7%. Em Portugal, nas lesões de alto grau a distribuição dos subtipos foi a seguinte: 16 (57,2%), seguido do 33 e 45 (ambos com 10,0%), 31 (7,5%) e 18 (2,5%), sendo os restantes casos (19,9%) atribuídos a outros subtipos. Já no CCU em primeiro lugar ficou o subtipo 16 (65,8%), seguido do 18 (12,8%), 33 (6,6%), 31 (2,7%) e 45 (1,6%), sendo os restantes casos (10,5%) atribuídos a outros subtipos. Este estudo permite concluir que na Europa, o subtipo que predomina tanto em lesões de alto grau como no CCU é o 16. (21)

A infecção por mais de um subtipo de HPV ocorre frequentemente, especialmente em jovens. Um estudo publicado em 2015 mostrou que apenas 28% das mulheres com CIN2/3 tinham múltiplos subtipos de HPV de alto risco, enquanto a maioria com a mesma lesão tinha apenas um subtipo de HPV de alto risco. Concluiu ainda que o HPV16 é o mais comum nestas lesões quer fosse sozinho ou em coinfeção com outro subtipo. (22)

e) Resposta imune

Ainda não está esclarecido porque algumas infeções resolvem e outras progredem para lesões pré-malignas. Acredita-se que possa haver uma suscetibilidade individual e outros cofatores envolvidos. Devido a esta discrepância pensa-se que o sistema imune do hospedeiro deve ter um papel importante na resolução da infeção. O facto de a infeção demorar até 2 anos a resolver mostra que a resposta imune é geralmente lenta e branda. A resposta imune do hospedeiro é limitada uma vez que o HPV dispõe de mecanismos para evadir a deteção imunológica. (5,10,17) Em primeiro lugar, o HPV é um vírus não lítico, ou seja, não provoca a morte da célula hospedeira e a libertação de partículas virais ocorre durante a morte programada dos queratinócitos durante a descamação. Além disso, o ADN do HPV só é suficientemente amplificado para um nível onde o vírus e as suas proteínas podem ser detetadas pelas células imunes do hospedeiro em queratinócitos parabasais, de modo que uma resposta imune funcionalmente ativa só pode ser gerada durante as fases posteriores da infeção por HPV. (5) Também é de salientar que o vírus infeta as células da camada basal que estão afastadas da circulação e conseqüentemente das células imunes circulantes nos estádios iniciais de infeção. Como não existe virémia, não existem sinais para a produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam as células apresentadoras de antígenos. Por último, as oncoproteínas do HPV têm mecanismos moleculares para facilitar a evasão do sistema imune como a redução de células de Langerhans, a inibição do MHC-I e a alteração da expressão do TLR-9. (5,10) As células de

Langerhans são células dendríticas localizadas nos epitélios que apresentam os antígenos aos linfócitos T. A redução destas células pode facilitar a persistência viral. (23)

Apesar dos mecanismos de evasão imune, a maioria das infecções por HPV apresentam uma potencial capacidade de resolução através, principalmente, da imunidade celular. (5) A imunidade celular tem um papel central na remoção da infecção pelo HPV embora ainda não completamente esclarecida. Grande parte das infecções resolve dentro de 1 a 2 anos através de mecanismos da imunidade celular.(7,8) A imunidade humoral tem respostas menos eficazes, com variabilidade em desenvolver anticorpos por genótipo de HPV e variabilidade entre as mulheres. Não se sabe a razão pela qual algumas mulheres desenvolvem anticorpos e outras não. No entanto, sabe-se que a imunidade adquirida para um subtipo de HPV modifica, pelo menos em algum grau, o risco de reinfeção com o mesmo subtipo. (8)

A infecção genital persistente por HPV tem sido associada com uma resposta imune celular específica fraca enquanto que a resposta específica por células T CD4 + e CD8+ está associada com a regressão espontânea da doença cervical e com uma melhor sobrevivência dos doentes com CCU. (6)

A maioria das mulheres saudáveis sem qualquer HPV genital gera resposta com células T contra as proteínas E2, E6 e E7 do HPV16. Evidências experimentais recentes sugerem que a proteína E2 do HPV16 tem um efeito antitumoral, promovendo a imunidade inata e a apoptose. Assim, a imunidade mediada por células contra a proteína E2 parece poder explicar as diferenças entre as mulheres com e sem doenças do colo do útero. (6)

Num estudo foi analisada a imunidade celular específica para as proteínas E2, E6 e E7 do HPV 16 em mulheres com CIN, comparativamente a um grupo controlo de mulheres HPV negativas. Concluiu-se que não existia diferença na imunidade celular específica entre as mulheres com CIN e os controlos, à exceção de uma maior secreção de IL-17 pelo HPV16 E6 dos controlos, podendo este ter um papel na indução de patologia pelo HPV. (6)

No entanto, em alguns indivíduos infetados, a infeção não é eliminada, e o vírus persiste.
São estes indivíduos que estão em risco de desenvolver cancro associado ao HPV. (5)

4- Cofatores do HPV

a) Tabaco

Vários estudos mostraram que existe uma associação entre o tabagismo e o CCU. (15,24,25) O tabaco é um cofator na carcinogênese cervical, existindo uma forte relação entre o este e o aparecimento de CIN3 e CCU. (26)

Depois da infecção por um HPV de alto risco, o tabagismo é o fator de risco ambiental mais significativo para o desenvolvimento de CCU. (26) Vários carcinogêneos derivados da nicotina foram encontrados no muco cervical em fumadoras. (27,28)

O papel do tabaco na carcinogênese cervical ainda não é bem conhecido. (26) O tabaco poderá ter um efeito direto no epitélio cervical como carcinogêneo ou poderá promover a carcinogênese através de um efeito imunodepressor com a supressão da resposta imune celular contra a infecção pelo HPV, permitindo a sua persistência. (23,25,26,29)

Um potencial mecanismo do tabaco é este ter um efeito genotóxico no ADN do epitélio cervical, promovendo a transformação maligna de células infetadas pelo HPV. (24,28,30,31)

O epitélio do colo do útero de fumadoras tem vários metabolitos carcinogênicos do tabaco, solúveis no muco cervical, o que vai levar a níveis aumentados de danos de ADN em comparação com não-fumadoras. (23,25,27)

O benzopireno é um carcinogêneo *major* do tabaco que poderá aumentar a síntese do HPV nas células cervicais. Altas concentrações deste carcinogêneo resultam em um grande aumento da carga viral o que poderá contribuir para a persistência do HPV e, conseqüentemente, favorecer a carcinogênese cervical.(26,31–34)

O tabaco poderá também aumentar a proliferação celular e o *turnover* na zona de transformação. O tabagismo já foi associado com o aumento da expressão de Ki-67, um marcador de proliferação e metaplasia. (31,34)

Estudos *in vitro* mostraram que outro modo do tabaco contribuir para a carcinogénese é através da metilação aberrante de ADN. Linhas celulares transformadas e não transformadas evidenciaram que a exposição a curto-prazo à nicotina ou fumo do tabaco é seguida de mudanças das ADN metiltransferases DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A metilação aberrante do p16, um gene supressor tumoral, também está fortemente associada a HSIL e CCU em mulheres fumadoras. (35)

Outro papel do tabaco poderia ser exacerbar o potencial efeito carcinogénico do HPV de evasão imune através da inibição de citocinas como o IFN- γ e do TNF- α o que levaria à inibição da apoptose e, conseqüentemente, o crescimento do tumor. Assim, o tabaco poderia contribuir para a capacidade de evasão do HPV. (27,30)

O tabaco suprime a resposta imune celular contra a infeção pelo HPV. (31,32) O tabagismo está associado a uma produção sistémica desequilibrada de citocinas pró e anti-inflamatórias. (34) Encontra-se também ligado a uma diminuição das células NK e da sua atividade, dos níveis circulatórios de IgG e IgA e das células de Langerhans. (23,36) Existe uma diminuição das células de Langerhans e dos linfócitos T CD4+ na zona de transformação do colo do útero. (32,36) Isto poderá conduzir a uma resposta diminuída pelas células T promovendo, assim, a persistência da infeção. (31,33)

Com base em um estudo de caso-controlo, o tabagismo é um fator de risco independente para CCU em mulheres infetadas com HPV de alto risco, apresentando o dobro do risco. (27)

Um estudo de coorte EPIC de 2014 com 308 036 mulheres mostrou que o tabagismo, o tempo de consumo e a intensidade duplicam o risco de desenvolver CIN3/CIS e CCU. Também evidenciou que a cessação tabágica tem um efeito benéfico, diminuindo duas vezes o risco de lesões pré-malignas e CCU. Para CIN3/CIS o risco reduzia significativamente, tornando-se igual ao das não fumadoras, após 10 anos de cessação enquanto que para o CCU o risco diminuía após 20 anos. O efeito do consumo tabágico inferior a 20 anos no risco de CIN3/CIS

foi apenas observado em mulheres seropositivas para o HPV. Isto significa que na ausência de infecção pelo HPV, o tabagismo é um fator de risco a longo termo enquanto que na presença de infecção não é necessário um período de tempo tão longo para o desenvolvimento de CIN3/CIS, sugerindo um efeito sinérgico entre o HPV e a duração do hábito tabágico. De igual forma, a cessação tabágica só é significativa em mulheres que não estavam infetadas pelo HPV. (25)

Collins *et al* realizaram um estudo em mulheres com idades entre os 15 e 19 anos que demonstrou que a carga tabágica (10 ou mais cigarros por dia) estava associada a um aumento do risco de CIN2/3 comparativamente com as não fumadoras. Além disso, evidenciou que nas mulheres não infetadas pelo HPV o tabagismo não tinha uma associação significativa com o risco de adquirir infecção pelo HPV. (35)

Segundo uma análise de 23 estudos epidemiológicos com 13 541 mulheres com cancro e 23 017 controlos o risco de carcinoma espinho-celular aumenta em fumadoras, sendo o risco tão mais elevado quanto maior for o número de cigarros fumados por dia e quanto mais jovem for a mulher quando iniciou os hábitos tabágicos. O aumento do risco relativo para atuais fumadoras em relação a nunca fumadoras foi de 1,6. Não houve relação com o tempo de consumo de tabaco. Ex-fumadoras tiveram um risco relativo de 1,12, não se verificando alteração do risco com o passar do tempo desde a cessação. Estes riscos foram semelhantes para CIN3 e CIS. (37)

De acordo com Gunnell *et al* a infecção pelo HPV16 tem um efeito sinérgico com o tabagismo no desenvolvimento de CIS. As mulheres fumadoras com infecção pelo HPV16 na primeira citologia (em média, 9 anos antes do diagnóstico de CIS) apresentaram um risco 14 vezes superior de CIS em comparação com as fumadoras sem infecção pelo HPV16. Além disso, as mulheres fumadoras com grande carga viral do subtipo 16 tinham um risco 27 vezes superior em comparação com mulheres fumadoras não infetadas. Por sua vez, as mulheres não fumadoras com infecção pelo HPV16 tinham apenas um risco 6 vezes superior de CIS

comparativamente às mulheres não fumadoras sem infecção. Também se verificou que existia uma interação potencializadora entre a duração do tabagismo (igual ou superior a 5 anos) e a presença de infecção pelo HPV16 no desenvolvimento de CIS. (30)

Similarmente, um estudo mostrou que mulheres infetadas por HPV oncogénico que eram fumadoras ou ex-fumadoras tinham um maior risco de CIN3 ou lesão superior do que as que nunca fumaram. Em adição, a carga tabágica e o tempo de consumo aumentavam esta associação, com um maior risco em mulheres que fumavam 40 ou mais cigarros por dia e que fumavam há 11 ou mais anos, podendo haver um possível efeito aditivo entre a intensidade e a duração. (28)

Vaccarella *et al* procuraram relacionar o tabagismo e a infecção pelo HPV. Entre as fumadoras, o risco de adquirir HPV aumentou com a carga tabágica (15 ou mais cigarros por dia com o dobro de risco comparado com não fumadoras). O risco entre ex-fumadoras era semelhante ao das não fumadoras. (36)

Outros autores mostraram que o tabagismo não é um fator de risco independente para CIN2, exceto em mulheres com infecção por HPV de alto risco. Evidenciaram que o tabagismo aumenta o risco de adquirir uma infecção por HPV de alto risco e de esta persistir. Não houve qualquer indicação de que o aumento do risco de CCU fosse mediado pelo aumento da progressão da doença entre as fumadoras. Em vez disso, o aumento do risco do CCU entre as fumadoras é atribuído ao aumento da aquisição de infecções por HPV de alto risco, dos quais o tabagismo foi um preditor independente. (38)

Um estudo que aferiu a relação entre o fumo do tabaco e a carga viral do HPV16 e 18 evidenciou que existia uma carga viral maior em fumadoras atuais em comparação com não fumadoras. Esta relação não se verificou para ex-fumadoras. A falta de relação entre a duração, a intensidade do tabagismo e carga viral pode indicar um limiar baixo para o efeito do tabagismo sobre a carga viral do HPV. (31)

Segundo Simen-Kapeu *et al* não há associação entre o uso de tabaco (fumado ou mascado) e o risco de múltiplas infecções pelo HPV. As mulheres com mais de 30 anos que consumiam tabaco de mascar tinham um aumento significativo do risco de HSIL. (39)

Matsumoto *et al* averiguaram a relação entre a regressão de LSIL e o tabagismo e concluíram que a probabilidade de regressão dentro de 2 anos era significativamente mais baixa em fumadoras quando comparada com não fumadoras (55,0% e 68,8%, respetivamente). O risco de persistência de LSIL aumentou com a intensidade e a duração tabágica e com o início do tabagismo em idades jovens. As fumadoras tiveram o dobro do risco de persistência da infecção pelo HPV comparativamente às não fumadoras. Para além disso, as mulheres mais jovens que eram fumadoras passivas desde a infância tinham uma probabilidade reduzida de regressão da LSIL dentro de 2 anos. (33)

Abaixo encontra-se uma tabela resumo dos vários estudos que demonstraram associação com o tabagismo ativo (tabela 1).

<u>Carcinogénese cervical</u>	<u>Estudos que demonstraram associação com tabagismo ativo</u>
Infeção e Persistência do HPV	Risco de adquirir HPV aumentou com a carga tabágica. (36)
	Tabagismo aumenta o risco de adquirir uma infeção por HPV de alto risco e de esta persistir. (38)
	A carga viral do HPV16 e 18 é maior em fumadoras. (31)
	Fumadoras com o dobro do risco de persistência da infeção pelo HPV. (33)
Lesões pré-malignas	Tabagismo e a carga tabágica duplicam o risco de desenvolver CIN3/CIS. A cessação tabágica diminuí duas vezes o risco de lesões pré-malignas. (25)
	Carga tabágica (≥ 10 cigarros/dia) associada ao aumento do risco de CIN2/3. (35)
	Risco de CIN3/CIS aumenta em fumadoras, sendo tão mais elevado quanto maior a carga tabágica e quanto mais precoce for o início dos hábitos tabágicos. (37)
	Fumadoras (≥ 5 anos) com infeção pelo HPV16 tinham um risco 14 vezes maior de CIS em comparação com as fumadoras sem infeção pelo HPV16. (30)

	Mulheres com mais de 30 anos que consumiam tabaco de mascar tinham um aumento significativo do risco de HSIL. (39)
	Mulheres fumadoras ou ex-fumadoras infetadas por HPV oncogénico que eram tinham um maior risco de CIN3 ou lesão superior do que as que nunca fumaram. (28)
	O risco de persistência de LSIL aumentou com a carga tabágica e com o começo do tabagismo em idades jovens. (33)
CCU	Tabaco é um fator de risco independente para CCU (dobro do risco) em mulheres infetadas com HPV de alto risco. (27)
	Tabagismo e carga tabágica duplicam o risco de desenvolver CCU. A cessação tabágica diminuí duas vezes o risco de CCU. (25)
	O risco de cancro aumenta em fumadoras (RR de 1,6 para atuais fumadoras; ex-fumadoras com RR de 1,12). (37)

Tabela 1- Estudos que demonstraram associação entre a carcinogénese cervical e o tabagismo ativo
CCU- Cancro do Colo do Útero; CIN- Neoplasia Intraepitelial Cervical; CIS- Carcinoma in situ; HPV- Vírus do Papiloma Humano; HSIL- Lesão Intraepitelial de alto grau; LSIL- Lesão Intraepitelial de baixo grau; RR- Risco Relativo

De outro modo, procurou comprovar-se se as mulheres sujeitas a fumo de tabaco passivamente estariam também em risco de desenvolver CCU. Para isso utilizaram dois coortes prospetivos de dois períodos diferentes (1963-1978 e 1975-1994) para analisar o papel do tabagismo passivo (fumadores eram membros do agregado familiar). Nas fumadoras ativas houve um aumento do risco de desenvolver neoplasia cervical, com risco relativo de 2,6 no coorte de 1963 e de 1,7 no de 1975. Para as fumadoras passivas havia um risco de 2,1 e 1,4 (não significativo), no coorte de 1963 e de 1975, respetivamente. Assim, os resultados mostraram que havia um papel de risco do tabaco tanto em fumadoras ativas como passivas. (24)

Um estudo da IARC de 2011 concluiu que o tabagismo passivo não é um fator de risco independente de CCU na ausência de tabagismo ativo. A ausência de uma associação independente com o tabagismo passivo não retira necessariamente a sua contribuição para o risco de CCU. Pode sim, sugerir que o efeito direto do tabagismo ativo supera o efeito carcinogénico indireto que o tabagismo passivo pode ter. A falta de associação com CIS e a associação significativa com CCU sugere que o tabagismo passivo poderá atuar como um

carcinogéneo tardio na transição de lesões pré-malignas para CCU. Um aumento do risco foi encontrado em casais em que ambos fumavam, apresentando o dobro do risco. Em suma, para além do papel do tabagismo ativo como cofator na carcinogénese cervical, o tabagismo passivo tem um potencial papel no desenvolvimento de CCU. (29)

Estudos mostraram que as fumadoras passivas tinham no seu muco cervical cotinina, um metabolito da nicotina, que também é encontrado em grandes concentrações no muco de fumadoras ativas. Isto pode sugerir que o tabagismo passivo também pode ter um papel na carcinogénese tal como o tabagismo ativo. (24,29)

Um estudo de 2015 com o objetivo de averiguar o papel conjunto do tabagismo e o uso de CHC por via oral no desenvolvimento de CIN demonstrou que estes fatores poderão atuar sinergicamente para aumentar o risco de CIN2/3. Este estudo evidenciou que o uso deste método contraceptivo estava associado a um elevado risco de CIN2/3 mas não de CIN1. Contrariamente, as fumadoras não tiveram qualquer associação quer com CIN2/3 quer com CIN1. No entanto, fumadoras que utilizavam CHC por via oral mostraram um aumento marcado do risco de CIN2/3, sem qualquer efeito no risco de CIN1, sugerindo um efeito sinérgico entre estes dois fatores. (32)

Num estudo não houve associação entre tabagismo e infeção pelo HPV ou lesões CIN1 ou superiores. (19) Já outro que analisou vários cofatores possíveis do HPV, o tabagismo foi associado como promotor da infeção pelo HPV, mas não se comprovou que tivesse um papel na progressão da infeção para CCU. (4) Estes resultados poderão ser explicados por tais estudos terem amostras relativamente pequenas.

b) Contraceptivos hormonais

Vários dados mostram uma associação entre o estado hormonal e o uso de contraceptivos hormonais com o risco de lesões pré-malignas e CCU. (23,40)

O epitélio do colo do útero permanece relativamente quiescente até ao aumento dos estrogénios e progesterona na puberdade, quando as células basais do fino epitélio colunar se transformam em células escamosas em um processo fisiológico designado por metaplasia escamosa. Esta zona de transformação é o local preferencial de CCU. A eversão da junção escamoso-colunar ocorre durante a gravidez e com o uso de contraceção hormonal combinada (CHC), facilitando a exposição direta ao HPV. (41) A zona de transformação onde o HPV atua é hormono-dependente. (41,42) Dados sugerem que as hormonas esteroides sexuais, principalmente a progesterona, podem atuar indiretamente nas células do epitélio infetadas pelo HPV e, deste modo, serem cofatores do HPV.(23,42) Além disso, as hormonas condicionam mudanças na imunidade da mucosa do colo do útero. (23)

O mecanismo como a CHC que afeta a carcinogénese dependente do HPV ainda não é conhecido. (43) Como já foi referido o epitélio do colo do útero tem recetores para estrogénios e progesterona. (44) A interação entre os recetores de estrogénio e progesterona e a CHC pode afetar a fisiologia do epitélio do colo do útero. (42) Um possível mecanismo para explicar a associação entre uso de CHC e risco de CCU é que o estrogénio e, principalmente, a progesterona podem interagir com recetores hormonais presentes no tecido do colo do útero e influenciar a história natural da infeção pelo HPV. (40) Pensa-se que os contraceptivos possam aumentar a probabilidade de infeção aquando a uma exposição ao HPV. Poderá também afetar a *clearance* ou a persistência da infeção ou a progressão da lesão pré-maligna. (43) Em adição, a CHC pode aumentar a incidência do ectrópion cervical o que vai deixar a junção escamoso-colunar mais exposta ao HPV. (26) Estas hormonas também poderão afetar as células do colo do útero, promovendo a integração do HPV no genoma do hospedeiro. Além disso podem estimular a transcrição do ADN do HPV e aumentar a proliferação celular. (26) As hormonas sexuais esteroides podem aumentar a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 o que irá promover a carcinogénese cervical.(26,40,45) O estradiol e a progesterona são ainda

imunomoduladores. O estradiol tem um efeito dose-dependente bidirecional na produção de citocinas enquanto que a progesterona, independentemente da concentração, suprime a produção de citocinas, a linfoproliferação e a função regulatória das células T. (26)

Os diversos estudos que associam o uso de CHC por via oral a um aumento do risco de CCU são inconsistentes. (46,47) Por isso é importante perceber se essa relação se verifica, uma vez que o consumo deste contraceptivos é cada vez mais comum. (46)

O uso a longo termo (superior a 5 anos) corrente ou recente de CHC por via oral foi relacionado como um fator que duplica o risco de CCU. No entanto, esse risco diminui após a suspensão do contraceptivo, ficando igual ao da restante população após 10 anos de cessação. (43,48)

Um estudo que incluiu 16 573 mulheres com CCU e 35 509 controlos em 24 estudos de coorte e casos-controlo revelou que em comparação com mulheres que nunca usaram CHC por via oral, o uso corrente igual ou superior a 5 anos está associado a um aumento do risco de cancro, com risco relativo de 1,9, não havendo diferença significativa com uso inferior a 5 anos. Além disso, o risco relativo diminuiu para 1,3 após a cessação, não se verificando risco superior ao controlo após 10 ou mais anos de cessação do contraceptivo. Para o CIN3 ou CIS o risco relativo foi de 2,23 para o uso corrente superior a 5 anos, diminuído para 1,36 após 10 ou mais anos de cessação. Assim, podemos ver que com o uso corrente de CHC por via oral o risco de CCU é tanto maior quanto mais longa for a utilização. O uso a longo termo igual ou superior a 10 anos aumenta o risco de CCU em mulheres infetadas pelo HPV. (43)

Uma meta-análise de 28 estudos mostrou também o aumento do risco relativo de CCU com o uso de CHC por via oral de 1,3 e 1,6 durante 5 a 9 anos, respetivamente, e de 2,3 e 2,5 para o uso igual ou superior a 10 anos. (48)

Segundo um estudo conduzido pela IARC, não havia um aumento do risco de cancro entre as mulheres que usaram CHC por via oral por 5 ou menos anos. Todavia o risco relativo

aumentava para 2,8 entre as mulheres que usaram este método contraceptivo durante 10 ou mais anos. Não houve correlação entre a positividade do HPV e uso de CHC por via oral entre os controles, indicando que estes não aumentam a aquisição de infecção pelo HPV ou a sua persistência. (48)

De acordo com um estudo de coorte EPIC com 308 036 mulheres o risco de lesões pré-malignas aumenta com a duração do uso de CHC por via oral e diminuiu com o aumento de anos desde a cessação do contraceptivo. Evidenciou ainda um menor risco de CIN3/CIS com a suspensão da CHC em mulheres que a utilizavam a curto e longo prazo. O risco de CCU também aumentou com a duração do uso do CHC por via oral, mas não significativamente. Observou-se ainda uma redução do risco de CIN3/CIS e CCU entre mulheres que utilizavam dispositivo intrauterino, contudo tal redução não foi significativa. (40)

Contrariamente, um estudo não encontrou relação entre o risco de CIN3 e o uso de CHC por via oral bem como a sua duração. Em adição, as mulheres com infecção persistente que utilizavam este método contraceptivo em comparação com as infetadas que nunca usaram tinham um risco diminuído de CIN3. (49)

Existem também vários estudos que não encontraram relação entre o uso de CHC por via oral e um aumento de risco de CCU. Um estudo de 2012 que analisou o papel de vários potenciais cofatores do HPV não demonstrou que os CHC fossem cofatores do HPV na carcinogénese. (4) Igualmente, noutro estudo não houve associação entre este método contraceptivo e a infecção pelo HPV ou lesões CIN1 ou superiores. (19) Similarmente, segundo outros autores o uso de CHC por via oral e contraceptivos hormonais implantáveis não estavam associados com CIN3. Deste modo, os contraceptivos hormonais não parecem aumentar o risco de adquirir infecção por HPV de alto risco nem de desenvolver CIN3 em mulheres infetadas. (45)

Similarmente, um estudo com mais de 12 000 mulheres onde se analisou o uso de vários métodos contraceptivos hormonais (oral, injetável, transdérmico, subcutâneo, vaginal e intrauterino) como fator de risco para infecção por HPV de alto risco, CIN ou CCU demonstrou que o uso de contraceptivos hormonais não é um fator de risco independente para CIN2/3. Para além disso, o uso de contraceptivos hormonais e a sua duração não pareceu aumentar o risco de infeções por HPV de alto risco e de lesões CIN2/3. Isto sugere que o efeito dos contraceptivos, caso exista, na carcinogénese cervical vai manifestar-se apenas após a progressão para CIN de alto grau, mas não é evidente antes. (46) De igual modo, outro estudo de coorte multicêntrico evidenciou também que o uso de CHC por via oral não é um fator de risco independente para os diferentes estádios da carcinogénese. Avaliou-se ainda o risco de CIN2/3 e HSIL em mulheres infetadas e não infetadas pelo HPV e verificou-se que o uso deste método contraceptivo não foi um preditor significativo destas lesões em ambos os grupos. Logo, segundo este estudo, a utilização de CHC por via oral não será um cofator do HPV. (47)

Uma possível explicação para o fato de a utilização de CHC por via oral e outros contraceptivos hormonais não estarem associados isoladamente a um risco aumentado de lesões pré-malignas e CCU é a de que as mulheres que utilizam este tipo de contraceção têm um estilo de vida diferente daquelas que o não utilizam, e o seu comportamento sexual ser diferente. (46,47) As mulheres que utilizam contraceptivos hormonais podem, por exemplo, ter a coitarca numa idade muito jovem, ter mais parceiros sexuais e não usar métodos de barreira. (26) Isto poderá aumentar o risco de exposição ao HPV que, por sua vez, poderá levar ao desenvolvimento de uma lesão pré-maligna, contribuindo para um risco aumentado de CCU e não propriamente o uso do contraceptivo por si só. Em suma, são os padrões comportamentais que conferem o verdadeiro risco de desenvolver CCU, ao invés do uso dos próprios contraceptivos. (46,47)

Apesar disso, um estudo de 2013 em mulheres australianas mostrou que o uso de CHC por via oral está inversamente associado com CIN e que o uso a longo prazo mostrou benefícios a reduzir o risco de CIN. Isto pode ser explicado pelo fato de estas mulheres terem relações sexuais estáveis com o mesmo parceiro. O potencial efeito protetivo poderá ser devido ao efeito destes contraceptivos na expressão do ADN do HPV e o estrogénio poderá proteger o sistema imune da mucosa contra a infeção precoce pelo HPV. Para além disso, influenciam a viscosidade do muco cervical o que afetará a penetração do HPV. (42)

Em mulheres que utilizavam contraceptivos injetáveis de progesterona há 5 ou mais anos existe também um pequeno aumento do risco de cancro (risco relativo 1.22) em comparação com os controlos. (43) Do mesmo modo, evidenciou-se que o risco de CCU era aumentado em mulheres que utilizavam contraceptivos injetáveis de progesterona. (48) Um outro estudo demonstrou ainda que mulheres infetadas por HPV oncogénico que utilizavam contraceção injetável tinham um risco 50% superior de desenvolver uma lesão CIN3 dentro de 2 anos quando comparadas com mulheres que não utilizavam este método contraceptivo (45), demonstrando que os contraceptivos injetáveis serão um cofator do HPV. No entanto, num outro estudo não demonstrou que os contraceptivos injetáveis de progesterona fossem cofatores do HPV na carcinogénese. (4)

Apesar do supramencionado, a OMS não recomenda a interrupção do uso de CHC por via oral uma vez que a sua utilização supera os seus riscos.(42)

A terapia hormonal de substituição (THS) em mulheres na pós-menopausa também poderá ter uma associação com o CCU. Mas neste caso crê-se que a THS diminua (44) ou não tenha qualquer impacto (26) no risco de carcinoma espinho-celular. O uso corrente desta terapia não foi associado à presença de lesões pré-malignas. Após 5 anos de uso de THS, o risco de carcinoma espinho-celular diminuiu 66%. Crê-se que a THS possa promover uma regressão das lesões pré-malignas espinho-celulares, cujo mecanismo se desconhece. (44)

Roura *et al* demonstraram uma redução no risco de CCU entre as mulheres peri e pós-menopausa que usam TSH com um efeito mais forte com o tempo de uso. A THS com estrogénio foi associada com um risco aumentado de CIN3/CIS enquanto a THS combinada foi inversamente associada com o CCU. Uma possível explicação para este efeito é que as mulheres que utilizam THS recorrem mais vezes a um médico especialista do que aquelas que a não utilizam, sendo, conseqüentemente, diagnosticadas e tratadas no início de lesões pré-malignas. Estes dados também sugerem que os estrogénios promovem a carcinogénese cervical enquanto a progesterona a inibe. (40)

c) Gravidez e Paridade

A gravidez é também um cofator do HPV no desenvolvimento do CCU (3,15,50), com a maioria dos estudos a evidenciar um aumento do risco diretamente relacionado com um aumento do número de gravidezes. (15)

Desconhece-se de que modo a paridade influencia a carcinogénese do HPV. (50) As mudanças hormonais e imunológicas próprias da gravidez ou o potencial trauma durante o parto poderão ser possíveis mecanismos.(15,49) Os níveis elevados de estrogénios e progesterona, especialmente durante a gravidez, bem como o trauma do parto são responsáveis pela eversão do epitélio colunar para o exocolo (ectrópion) o que expõe a junção escamo-colunar, mantendo-se a zona de transformação no exocolo por muitos anos. Isto irá facilitar a exposição direta ao HPV. (40,51) Os estrogénios poderão também estimular a expressão dos genes do HPV, influenciar a resposta imune cervical e estimular a proliferação celular da zona de transformação. (49) Para além disso, estudos experimentais *in vitro* indicam a presença de elementos que reconhecem hormonas no LCR dos HPV de alto risco. (23) Como já referido, outro mecanismo possível é a imunomodulação relacionada com uma gravidez que poderia

reforçar o papel do HPV na carcinogénese cervical. Durante a gravidez poderá haver uma diminuição da resposta humoral ao HPV. (40,50,51)

Segundo um estudo com mais de 10 000 mulheres, as mulheres múltíparas com 4 ou mais partos vaginais tem um risco superior de CCU em relação às mulheres nulíparas ou com baixa paridade vaginal (RR de 2,2). Esse risco ocorre apenas em mulheres infetadas pelo HPV. Se a mulher não está infetada a paridade vaginal não influencia o risco, uma vez que o trauma por si só não vai causar CCU. (3) Outro estudo mostrou que a proporção de mulheres com anormalidades no resultado da citologia era significativamente maior durante a gravidez. (50)

Rajkumar *et al* analisaram a relação entre os fatores reprodutivos e o CCU e evidenciaram que o risco relativo era de 1,76 para mulheres múltíparas com 7 ou mais gravidezes de termo em comparação com 1 ou 2 gravidezes. A idade jovem da primeira gravidez de termo foi associada a um maior risco de CIN3, CIS e CCU. O risco relativo para mulheres com menos de 17 anos em comparação com as de idade igual ou superior a 25 foi de 1,77 para CCU e 1,78 para CIN3 e CIS. Para CIN3 ou CIS não houve um aumento de risco para mulheres múltíparas. (51)

Já um estudo de 2013 evidenciou que o parto aumenta o risco de CIN3 em mulheres com persistência de infeção pelo HPV, não se tendo observado aumento de risco com a gravidez. O aumento do risco em relação ao parto e não com o número de gravidezes poderia indicar que a explicação biológica é relacionada com o primeiro e não com o segundo. Além disso, mulheres grávidas que sofreram abortos ou gravidezes ectópicas não tiveram aumento do risco de CIN3 comparativamente com mulheres que nunca estiveram grávidas. (49)

Num estudo EPIC de 2016 concluiu-se que as mulheres múltíparas apresentaram maior risco de CIN 3/CIS do que as mulheres nulíparas, mas não foram encontradas associações com CCU. Também evidenciaram que poderá haver um efeito sinérgico entre multiparidade e o uso

de CHC por via oral. Estes fatores de risco não agiriam independentemente, mas sim como cofatores do HPV na promoção da carcinogênese cervical. (40)

De acordo com a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia do Colo do Útero o risco de progressão de CIN 2/3 para CCU durante a gravidez é mínimo, e a taxa de regressão espontânea pós-parto é relativamente alta. Estudos da evolução de HSIL durante a gravidez e no pós-parto demonstraram uma taxa de progressão para carcinoma microinvasivo de 3,4%, com um risco de progressão para carcinoma invasivo de 0,1%. (52)

Existem também estudos em que não se estabelece relação entre a paridade e o risco de CCU. Por exemplo, Ribeiro *et al* evidenciaram não existir associação entre a multiparidade com a infecção pelo HPV ou lesões CIN1 ou superiores. (19) Trottier *et al* também analisaram o risco de infecção pelo HPV e lesões pré-malignas durante e após a gravidez e concluíram que não havia associação entre estes. (50) De igual modo, noutro estudo, antecedentes de gravidez, a idade da primeira gravidez e o número de gravidezes e partos não foram associados com CIN3, concluindo-se que a gravidez e paridade não aumentavam o risco de infecção por HPV nem de desenvolver CIN3 em mulheres infetadas.(45) Yetimalar *et al* demonstrara que a multiparidade estava associada com a infecção pelo HPV, mas não com risco de evolução para CCU. (4)

d) Imunossupressão

As mulheres imunocomprometidas estão em maior risco de ter lesões pré-malignas e CCU. (53) Existe um aumento marcado do risco de CCU em mulheres imunossuprimidas devido à SIDA ou à terapia após transplante de órgão. Existe também um aumento do risco de lesões pré-malignas em mulheres com algumas doenças autoimunes, principalmente se tratadas com imunossupressores. (26,54)

As transplantadas de órgãos têm um risco aumentado de CCU devido à terapêutica imunossupressora instituída para evitar a rejeição do enxerto. Há uma ligação entre a dose e a

duração da terapêutica imunossupressora no desenvolvimento de cancro após o transplante, mas não com o tipo de imunossupressor. Por outras palavras, as doentes transplantadas têm um aumento do risco de CCU devido à sua imunossupressão iatrogénica. (53,54)

As transplantadas renais sob terapia imunossupressora têm um risco 2 a 6 vezes maior de CIN e o triplo do risco de CCU. (55)

Os imunossupressores utilizados na terapêutica podem afetar diretamente o ADN através da inibição dos mecanismos de reparação deste. Isto vai levar a alterações irreversíveis do ADN e, conseqüentemente, ao cancro. (55) Sabe-se que a azatioprina e ciclosporina têm propriedades carcinogénicas, tais como a produção de fatores de crescimento e a inibição dos mecanismos de reparação do ADN. (53)

Por outro lado, as doentes transplantadas sob terapêutica imunossupressora têm uma capacidade diminuída de eliminar a infeção pelo HPV. Para além disso, quando iniciam a medicação imunossupressora poderão ativar uma infeção latente pelo HPV, o que resulta no aumento da carga viral. (55)

Tendo em conta isto, recomenda-se que as transplantadas façam citologias anualmente. (53,54)

A incidência de CIN aumenta em mulheres com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e há um aumento adicional com terapêutica imunossupressora. (26) Verificou-se que a prevalência de ASC-US, CIN1 e CIN2/3 era significativamente maior em doentes com LES em comparação com os controlos. Além disso, estas doentes tinham um risco 11 vezes superior de prevalência de CIN2/3. Constatou-se ainda que as mulheres com LES com uso a longo termo de terapêutica imunossupressora tinham uma prevalência ainda maior de CIN em comparação com as que não usavam a longo termo. (56) Similarmente, um outro estudo demonstrou que o risco de CIN em mulheres com LES tratadas com imunossupressores, como a ciclofosfamida ou azatioprina, era maior em comparação com as não tratadas. (57)

No que concerne à Doença Inflamatória Intestinal (DII) não parece haver uma associação entre esta e o aparecimento de CIN. (58) Segundo Singh *et al* não existe uma associação entre a DII e o risco de desenvolver alterações citológicas. O que poderá provocar um aumento de alterações citológicas é a medicação imunossupressora que estas doentes fazem, principalmente a combinação de corticoides e imunossupressores como a azatioprina, metotrexato, ciclosporina ou infliximab. (59)

Por outro lado, evidenciou-se que as mulheres com DII tinham por si só um maior risco de alterações citológicas, em comparação com mulheres saudáveis. As mulheres que utilizavam imunossupressores no tratamento desta doença apresentavam um risco adicional. (60) Contrariamente, um estudo de Lees *et al* não demonstrou um aumento do risco de CIN em doentes com DII, nem mesmo quando estas doentes eram tratadas com imunossupressores. (58)

A imunossupressão severa associada ao Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) / SIDA é importante no desenvolvimento de CCU. (54)

A infeção pelo HPV é mais comum em mulheres seropositivas para VIH. (61) Em mulheres infetadas pelo VIH existe um aumento do risco de infeção por HPV de alto risco de acordo com Denny *et al*. (62) As mulheres que estavam infetadas pelo HPV tinham maior imunodepressão, com menores contagens de CD4+ e alta carga viral do VIH. A maioria das mulheres tinha alterações na citologia, sendo a maioria LSIL. No entanto, a progressão para HSIL, após 36 meses, ocorreu numa minoria dos casos. A maioria das mulheres que adquiriu a infeção pelo HPV após o início do estudo, ou seja, que eram inicialmente negativas para o HPV, teve uma infeção persistente, com apenas 6% sem infeção após 18 meses. Tal poderá ser explicado pelo facto de a clearance do HPV não se associar com a contagem de CD4+, mas sim com a carga viral do VIH. Acredita-se que embora os níveis de CD4+ se correlacionem inversamente com a carga viral, o essencial para a clearance de HPV é a atividade citotóxica funcional das células CD8+. A este respeito, a função das células T CD8+ nos seropositivos

para o VIH tem sido comprometida devido à sobreexpressão da expressão de PD-1, e este correlaciona-se fortemente com a carga viral sendo revertido pela terapêutica antirretroviral (TARV). (62)

O nível plasmático de ARN do VIH e a contagem de células CD4+ em combinação parecem ter uma associação mais forte com a incidência de infecção pelo HPV do que com a persistência do HPV. Uma das razões para a associação mais forte com a incidência poderá ser a reativação da infecção pelo HPV em mulheres com contagens inferiores a 500 células/ μ L. (63)

O risco de CIN2/3 estava significativamente associado a baixas contagens celulares de CD4+ num estudo de 2015. Mesmo decréscimos moderados da contagem celular de CD4+ (contagens entre 200 e 349 células/ μ L) aumentaram substancialmente o risco de CIN2/3. Também mostrou um efeito protetor após 2 ou mais anos de uso de TARV contra o desenvolvimento de CIN2/3. Encontraram-se associações semelhantes para CCU com contagens de CD4+ de 50 células/ μ L. (64)

A infecção pelo VIH está associada ao aumento da incidência de CIN. Um estudo de coorte mostrou que apesar de haver frequentemente alterações na citologia em mulheres infetadas pelo VIH, a maioria dessas alterações era ASC-US ou LSIL. (61)

Em mulheres com citologia cervical normal e negativas para infecção por HPV oncogénico, a infecção pelo VIH não foi associada a um aumento do risco de CIN em 5 anos. A incidência cumulativa de CIN2 ou superior foi de 5% em mulheres com e sem infecção pelo VIH. (65)

Abraham *et al* evidenciaram que existe uma incidência elevada de CCU em mulheres infetadas pelo VIH comparativamente as não infetadas e que as taxas aumentavam com a imunossupressão. Mulheres seropositivas com contagens celulares T CD4+ de ≥ 350 , 200-349 e < 200 células/ μ L tinham, respetivamente, um aumento da incidência de CCU 2.3, 3 e 7.7 vezes maior comparativamente às mulheres não infetadas. (66)

Contrariamente, um estudo prospetivo de 2009 com mulheres infetadas pelo VIH, demonstrou que a incidência de CCU nestas não foi significativamente maior em comparação com mulheres não infetadas. Os autores atribuíram esses resultados ao facto de as mulheres serem constantemente avaliadas e, caso necessário, tratadas. (67)

Em várias análises demonstrou-se que baixas contagens celulares de CD4+ (≤ 200 células/ μ L) são o preditor mais forte de infeção por HPV de alto risco. (68)

Em mulheres seropositivas para o VIH, os níveis plasmáticos de ARN do VIH, como já foi referido, estão associados a um risco de infeção pelo HPV e de neoplasia cervical. No entanto, pouco se sabe em relação aos níveis de ARN do VIH no trato genital e como se relaciona com o HPV e o risco de neoplasia. Para tentar perceber essa relação, Gharthey *et al* analisaram os níveis de ARN do VIH no trato genital e a sua relação com incidência de HSIL, e evidenciaram que havia relação entre ambas mas que esta relação tornava-se insignificante após ajustamento para os níveis plasmáticos de ARN do VIH. (69)

O VIH terá influência na imunidade celular, promovendo a persistência da infeção pelo HPV e, conseqüentemente, a progressão para CIN, principalmente em mulheres com contagens de linfócitos T CD4+ baixas e com altos níveis plasmáticos de ARN VIH. (26)

Huchko *et al* analisaram o uso de TARV em mulheres seropositivas para o VIH com aumento da concentração do vírus no trato genital e a associação com CIN2/3, demonstrando que as mulheres que faziam regimes HAART (*highly active antiretroviral therapy*) não tinham um risco aumentado de CIN2/3. Esta terapêutica mostrou reduzir efetivamente a concentração do VIH no trato genital. (70)

Antes do surgimento da HAART, a ocorrência de neoplasia cervical associada ao HPV era quase 5 vezes mais provável em mulheres infetadas pelo VIH do que em mulheres não infetadas. Após a disseminação da HAART esse cenário mudou uma vez que parece ter um papel protetor contra o aparecimento de alterações citológicas. A cada vez maior tendência de

tratar as mulheres seropositivas com HAART poderá reduzir o impacto da imunossupressão e fazer com que o curso da infecção pelo HPV se torne mais similar ao das mulheres seronegativas. No entanto, assim como nas mulheres imunocompetentes, os subtipos de HPV de alto risco e a múltipla infecção por vários subtipos estão associados ao surgimento de lesões pré-malignas. Para além disso, as mulheres sujeitas a HAART viverão mais anos, estando, por esse motivo, mais sujeitas ao desenvolvimento de lesões. (54,71)

Existem também estudos que demonstraram não existir um efeito significativo da HAART no risco de CCU. (54)

Segundo diversos autores, o efeito da resposta imune entre mulheres infetadas pelo VIH é menos importante na prevalência do HPV16 em comparação com outros subtipos e que este subtipo é menos comum em HSIL em mulheres positivas para o VIH. Todavia, não parece haver diferença da distribuição dos subtipos de HPV entre mulheres infetadas e não infetadas pelo VIH. (68,71,72)

Para além da imunossupressão provocada pelo VIH, poderão existir outros mecanismos. Estudos *in vitro* indicaram que a expressão da proteína tat do VIH poderá aumentar a expressão dos genes E1 e L1 do HPV e a transcrição do oncogene E7 do HPV16. (71,73) No entanto não se sabe como o VIH poderá aumentar o risco de replicação do HPV *in vivo*. Em adição, o VIH poderá induzir uma resposta inflamatória que interfere com a capacidade de gerar uma resposta imune efetiva contra a infecção pelo HPV, o que levaria à persistência. (73)

Tendo em conta o risco aumentado de lesões pré-malignas e CCU, recomenda-se que pacientes com VIH/SIDA façam citologias anualmente. (54)

e) Coinfecção com outras IST

Diversos estudos demonstraram que outras infeções sexualmente transmissíveis (IST) poderiam ser possíveis cofatores do HPV na carcinogénese cervical. (74) Os agentes

potencialmente envolvidos na carcinogênese são a *Chlamydia trachomatis* (CT), o Herpes simplex vírus 2 (HSV2), *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis* (TV). (75) Todavia, a influência dos diferentes agentes infecciosos e a sua associação com o HPV ainda não está esclarecida. (75,76)

De acordo com Wohlmeister *et al* existe uma associação entre anomalias citológicas e a coinfeção pelo HPV e CT. Evidenciaram ainda que ambos os agentes estão ligados à fase inicial da carcinogênese cervical.(75)

Por outro lado, um estudo sobre a coinfeção entre HPV e CT demonstrou que em mulheres com 25 ou menos anos com uma lesão de baixo grau não houve uma associação significativa entre a lesão e a distribuição HPV e CT, no entanto a coinfeção por estes agentes foi significativamente associada à presença de lesões. (77)

Segundo Silins *et al* a persistência de infecções por HPV de alto risco é mais comum entre mulheres previamente infetadas com CT. (78)

Lehtinen *et al* demonstraram que existia uma associação moderada entre a coinfeção por CT e HPV e o risco de CIN2, no entanto esse excesso de risco não existia para CIN3 ou CCU. Esse efeito terá lugar numa fase inicial da carcinogênese.(79)

Contrariamente, outros autores evidenciaram que a coinfeção por CT e HPV não estava associada a um aumento do risco de CIN2 e outras lesões pré-malignas.(80)

Segundo um estudo do EPIC o aumento do número de IST está associado a um aumento do risco de CCU. Evidenciou que o risco de CIN3/CIS e CCU aumenta linearmente com o número de IST que as mulheres tinham, incluindo HPV, CT e HSV-2. Mostrou também que para além do papel fundamental do HPV existia uma possível contribuição da CT e HSV-2 na carcinogênese cervical. Mulheres seropositivas para CT tinham um risco aumentado de CCU, risco esse menos evidente para CIN3/CIS. Para mulheres com HSV-2, o risco também não foi muito significativo. (74)

Similarmente, Paba *et al* avaliaram a coinfeção com CT e HSV2 em células infetadas pelo HPV e como esta se relacionava com alterações das vias intracelulares. Demonstraram que a infeção por CT estava relacionada com a infeção por múltiplos subtipos de HPV, enquanto a infeção por HSV2 não obteve resultados significativos. (76)

Evidências de estudos observacionais não suportam o efeito prejudicial da infeção pelo HSV2 no CCU. (81)

Estas infeções poderão causar inflamação crónica e, por essa via, seriam um possível fator de risco para a transmissão e persistência do HPV. (75,77) Estes agentes provocam processos inflamatórios e microabrasão ou microtrauma do epitélio do colo do útero o que, por sua vez, promove a infeção e persistência do HPV. (75) O aumento do risco de CCU relacionado com estas infeções poderá resultar da resposta inflamatória que tem sido associada à geração de radicais livres e ao desenvolvimento de instabilidade genética. (74)

NF- κ B são fatores de transcrição que têm um papel crítico na regulação intracelular da resposta imune, inflamação e controlo do ciclo celular. NF- κ B nuclear e citoplasmático, VEGF-C e survivina estavam significativamente aumentados em lesões com coinfeção pelo HPV e CT. Já nas lesões com coinfeção pelo HPV e HSV2 apenas estava aumentado a survivina. As citocinas são essenciais no desenvolvimento da resposta imune, no entanto, se persistem, podem causar danos nos tecidos devido a inflamação crónica. Estudos mostraram que a infeção pela CT provoca a sobreexpressão de IL-8, uma citocina pró-inflamatória, que é responsável pelo dano tecidual. As vias de sinalização do hospedeiro são essenciais para a indução de IL-8 e o NF- κ B contribui para tal. Isto poderá explicar o aumento do NF- κ B nas lesões. (76)

VEGF-C tem um papel importante na fase inicial da carcinogénese cervical. A proteína E6 sobrerregula a expressão de VEGF. A survivina pertence a família das proteínas inibidoras da apoptose. A infeção por CT inibe a apoptose impedindo a ativação das caspases que são responsáveis por destruir as células através da sobrerregulação da survivina. A inibição da

apoptose também pode ser induzida por proteínas virais como é o caso da glicoproteína D do HSV que ativa o NF-κB que, por sua vez, faz com que haja a sobreexpressão de genes anti-apoptóticos como o gene da survivina. (76) Assim, a capacidade anti-apoptótica poderá influenciar a história natural da infecção pelo HPV. (82)

Infeções por CT favorecem a infecção e persistência de múltiplos subtipos de HPV de alto risco o que poderá levar à integração viral e à inibição da apoptose (via survivina) e à sobreexpressão dos oncogenes E6/E7. (76,82)

A CT é um potente imunogénico que estimula fortemente a via da inflamação crónica e provoca a longo prazo danos no tecido epitelial. (77) Em alguns casos poderá causar atipia, hipertrofia cervical e metaplasia escamosa, favorecendo a aquisição de HPV, o que aumenta o risco de neoplasia. (77,79,82) A CT terá um papel na transformação celular, promovendo danos na barreira mucosa, que permitem a infecção pelo HPV. (77,82) Interfere também na *clearance* do HPV criando instabilidade cromossómica e facilitando o processo inflamatório. (77) A infecção ocorre nas células imaturas do endocólio, provocando metaplasia. A metaplasia poderá ser um potencial fator associado à infecção por HPV de alto risco, uma vez que o vírus infeta preferencialmente epitélios metaplásicos. (75,82)

A CT poderá causar imunodepressão local. (79) A infecção por CT provoca inflamação crónica com diminuição das células apresentadoras de antígenos, induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-8 e provoca uma mudança a favor da resposta imune humoral em detrimento da resposta celular, favorecendo a persistência da infecção pelo HPV. (76,78,82)

Existem evidências de que fibroblastos humanos infetados *in vitro* pela CT respondem à infecção com a redução da expressão do gene supressor tumoral *caveolin-1* e com a sobreexpressão do oncogene *c-myc*.(76)

A infecção por CT também pode aumentar a expressão do Ki67, tal como o HPV e outros carcinogénicos.(82)

Algumas regiões do genoma do HSV2, nomeadamente os fragmentos *Bam*HI ou *Bgl*III N, têm capacidade de transformar células humanas *in vitro* e estas sequências são frequentemente encontradas em células do CCU associadas com sequências do HPV. (76)

O possível sinergismo entre HPV e HSV2 na carcinogénese também foi suportado por estudos *in vitro* que demonstraram que o subfragmento *Xho*I do genoma do HSV2 induz a transformação maligna de células imortalizadas infetadas pelo HPV. O HSV2 infeta a junção escamo-colunar, tal como o HPV. As lesões herpéticas poderiam facilitar a entrada do HPV na camada basal e induzir uma resposta inflamatória que poderia reduzir a habilidade da mulher criar uma resposta imune mediada por células *T-helper*, enfraquecendo a possibilidade de clearance da infeção pelo HPV. Tudo isto facilitaria a persistência do HPV. No entanto, como o HSV2 não é consistentemente encontrado em CCU, o seu papel na carcinogénese ainda é questionado. Não existem evidências de que o HSV2 possa facilitar a integração do genoma do HPV no genoma do hospedeiro.(76)

Em mulheres infetadas com HPV de alto risco, a presença de TV aumentou a probabilidade de existir anomalias na citologia, com um aumento de LSIL, mas não de HSIL. (83)

A vaginose bacteriana (VB), uma alteração da flora vaginal envolvendo uma diminuição dos lactobacilos com predominância de bactérias anaeróbias, também poderia estar positivamente associado à infeção pelo HPV. (84) Similarmente, parece existir uma associação entre VB e a presença de CIN uma vez que numa meta-análise as taxas de CIN foram maiores em mulheres com VB comparativamente as sem VB. (85)

A diminuição de lactobacilos poderá aumentar a suscetibilidade de adquirir uma IST. A VB também aumenta as enzimas de degradação da mucina no fluido vaginal e estas degradam a camada de revestimento do epitélio cervical causando microabrasões ou alterações das células epiteliais. Estas enzimas podem promover a virulência através da destruição da barreira mucosa

e, conseqüentemente, aumentar a suscetibilidade à infecção pelo HPV facilitando a aderência, invasão e, eventualmente, a integração no genoma das células da zona de transformação do hospedeiro. Em adição, pode afetar a imunidade local. (84)

Existem várias evidências que as mulheres com alterações da flora vaginal têm mais frequentemente alterações citológicas, demonstrando que poderá haver uma relação entre VB e o desenvolvimento de CCU. Um elevado pH da vagina, como se observa na VB, pode causar metaplasia escamosa no colo do útero de mulheres após a puberdade e prolongar o período em que a zona de transformação é vulnerável ao HPV. Para além disso, os anaeróbios da VB produzem aminas que em conjunto com os nitritos formam nitrosaminas. Estas são carcinogénicas e provocam alterações no ADN. Contudo, ainda não existe consenso relativamente a um papel da VB na carcinogénese cervical. (85)

f) Suscetibilidade genética

Os fatores genéticos que influenciam o controlo da infecção do HPV existem mas são pouco conhecidos. (12) Resultados de um estudo com gémeos monozigóticos demonstraram que existe um mecanismo genético para o surgimento de CIS. Existem também evidências de que estes fatores contribuem para a persistência e progressão da infecção pelo HPV. (86)

Os polimorfismos de nucleótido único (SNP) foram associados ao aumento do risco de CIN3 ou CCU e com a persistência do HPV. O SNP FANCA (*Fanconi anemia complementation group A*) foi relacionado com o aumento do risco de CIN3 ou CCU. Supõe-se que o FANCA tenha um papel no reconhecimento de danos de ADN e na sua reparação. Já o SNP do gene imune inato IRF3 foi associado a um aumento da persistência do HPV. Este terá um papel na persistência de várias infecções virais. (87) Existem mais polimorfismos que estão envolvidos em funções como a reparação de ADN, infecção viral e entrada do vírus na célula. (88)

A única associação consistente é com o antígeno leucocitário humano (HLA), apoiando a importância das células T no controlo da infeção pelo HPV e das lesões pré-malignas. (12) O HLA poderá ter um papel na clearance da infeção pelo HPV e na progressão para cancro. (26)

As moléculas de HLA de classe I, presentes na maioria das células somáticas nucleadas, apresentam péptidos antigénicos às células T citotóxicas CD8+ enquanto que as moléculas de classe II expressas em células apresentadoras de antígenos apresentam péptidos degradados em vesículas intracelulares em células T *helper* CD4+. Uma resposta imune efetiva necessita de uma apresentação antigénica adequada por ambas as classes para ativar uma resposta. (89)

Um estudo sugeriu que existe uma associação entre o polimorfismo do alelo HLA-A e a carcinogénese cervical. Evidenciou que existia uma associação inversa entre HLA-A*0206 e o risco de cancro e uma associação positiva entre HLA-A*2402. (89) Outros estudos mostraram associações semelhantes com outros polimorfismos de HLA. (90–92)

5- Discussão e Conclusão

A carcinogênese cervical tem vários estádios que incluem a infecção aguda pelo HPV e a sua persistência no colo do útero. Posteriormente, desenvolve-se uma lesão pré-maligna que mais tarde culmina na invasão, ou seja, no surgimento de CCU. Estes estádios mostraram ser necessários não sendo possível o aparecimento de cancro na ausência de HPV. Contudo, como nem todas as infecções pelo HPV vão culminar em CCU, concluiu-se que outros cofatores existiriam e influenciariam a história natural. Já foi possível identificar alguns cofatores, nomeadamente o tabaco, o uso de contraceptivos hormonais, a gravidez e paridade, a imunossupressão, a coinfeção por VIH ou por outros agentes infecciosos e os polimorfismos genéticos.

Relativamente ao tabaco, é um cofator bem estabelecido e sabe-se que vai interferir em todas as fases da carcinogênese cervical. Em primeiro lugar, favorece a infecção pelo HPV e está associado a um aumento da carga viral o que poderá facilitar a persistência do vírus. Por outro lado, parece ter um efeito sinérgico com o HPV pela promoção do aparecimento de lesões pré-malignas e de CCU. O mecanismo pelo qual o tabaco é um cofator ainda não é bem conhecido mas supõe-se que seja pelo seu efeito imunodepressor ou pelo seu papel de carcinogéneo com um efeito genotóxico. Para além disso, parece haver uma relação entre a carga tabágica e o surgimento de lesões. Foi, ainda, evidenciado que as fumadoras passivas podem, também, estar em risco. Não obstante, esta associação ainda não se encontra completamente esclarecida. Assim, o conhecimento deste cofator tem um grande impacto na prática clínica uma vez que pode incentivar e reforçar a cessação tabágica das mulheres de modo a diminuir o risco de CCU. Todavia, como ainda é necessário compreender melhor o papel do tabaco na carcinogênese, torna-se evidente a necessidade de mais estudos sobre este cofator.

Quanto à contraceção hormonal combinada, uma vez que esta é muito usada em todo o mundo, torna-se essencial identificar e compreender o seu papel na carcinogênese cervical. Os

estudos atualmente existentes são discordantes mas o risco de CCU parece aumentar paralelamente ao período de realização de CHC, sendo especialmente significativo quando este período é superior a 5 anos. Por outro lado, parece também existir um risco aumentado de cancro em mulheres que usam contraceptivos injetáveis de progesterona. A zona de transição é hormono-dependente pelo que o uso de CHC aumentará a exposição desta zona ao HPV e parece ter uma influência na imunidade local. Porém, os mecanismos fisiopatológicos da CHC ainda não estão bem esclarecidos. A cessação do uso de CHC por via oral demonstrou ser benéfica diminuindo o risco de CCU para um valor equivalente ao da população em geral após 10 anos de descontinuação.

O papel da gravidez na progressão das lesões aparenta ser mínimo. Contudo, parece haver um aumento do risco de CCU com a multiparidade (igual ou superior a 4 partos). Foi demonstrado que a influência da paridade é mais marcada no surgimento de lesões CIN3. No entanto, o mecanismo ainda não está bem elucidado, supondo-se que as alterações hormonais e imunológicas próprias da gravidez bem como o trauma do colo do útero aquando do parto possam estar envolvidas.

As mulheres com imunossupressão também parecem ter risco aumentado de CIN e CCU. As mulheres sob terapêutica imunossupressora têm menor capacidade de eliminar uma nova infeção ou poderão ativar uma infeção latente. Para além disso, esta medicação pode ter um efeito carcinogénico, afetando diretamente o ADN, tendo-se verificado uma possível ligação entre a dose e a duração da terapêutica. Relativamente às doenças autoimunes, já se comprovou associação entre o Lúpus Eritematoso Sistémico e o aumento do risco de CIN. Ainda assim, esta associação ainda não está comprovada para a Doença Inflamatória Intestinal.

O VIH, por sua vez, altera a história natural da infeção pelo HPV. As mulheres infetadas por este vírus parecem estar mais sujeitas à infeção e à persistência de múltiplos subtipos de HPV, o que leva, conseqüentemente, a um maior risco de lesões pré-malignas e CCU. Este risco

parece relacionar-se com o nível plasmático de ARN do VIH e com a contagem de células CD4+. Acresce que o VIH parece atuar através da diminuição da imunidade celular, a qual é fundamental na *clearance* da infeção do HPV. Poderá, ainda, haver um papel sinérgico entre estes dois vírus, que ainda não é claro. Não obstante, o uso da HAART parece diminuir o risco de lesões, sendo necessária mais investigação para melhor compreender esta associação.

Para além do VIH, outras IST poderão ser cofatores do HPV. A *Chlamydia trachomatis* e o herpes simplex vírus 2 são os que reúnem mais estudos sem que os resultados sejam sempre consistentes. A CT parece ter um papel mais marcado na fase inicial da carcinogénese cervical, ou seja, na infeção e persistência do HPV. Contudo, evidenciou-se que a mesma pode estar relacionada com o surgimento de lesões pré-malignas e CCU. Já a coinfeção com HSV2 não tem um papel tão claro mas parece associar-se ao aumento do risco de lesões. O mecanismo destes agentes tem por base a promoção de inflamação crónica a nível do colo do útero, existindo, ainda, uma imunossupressão local e um efeito genotóxico e antiapoptótico.

Quando aos cofatores genéticos, sabe-se que existem, sem que se encontrem ainda bem estabelecidos. Os mais esclarecidos são os polimorfismos do HLA que parecem influenciar a imunidade.

Em suma, esta revisão permitiu concluir que, apesar da infeção pelo HPV ser necessária para o aparecimento do cancro do colo do útero, esta não é suficiente, pelo que existem outros cofatores deste vírus que vão ser fundamentais para a carcinogénese. Com este trabalho foi possível identificar alguns dos cofatores existentes e o respetivo papel na patogénese do HPV. A compreensão destes cofatores é de extrema importância na prática clínica uma vez que permite entender melhor a evolução da infeção pelo HPV numa determinada mulher e possibilita a identificação e modificação precoce do mesmo, o que pode levar à alteração da história natural da infeção HPV e, possivelmente, à diminuição do risco de CCU. Assim, devem ser realizados mais estudos para esclarecer os cofatores envolvidos no CCU.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias, por todo o apoio, incentivo, dedicação e disponibilidade prestada ao longo da realização deste projeto.

À minha coorientadora, Dra. Mariana Vide Tavares, por todo o apoio e disponibilidade concedida ao longo deste trabalho.

Aos meus pais, à minha família e aos meus amigos por todo o apoio, incentivo e ânimo que me deram.

Referências bibliográficas

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. Doenças Oncológicas em números – 2014. Ministério da Saúde - Direção-Geral de Saúde. 2014.
3. Liao SF, Lee WC, Chen HC, Chuang LC, Pan MH, Chen CJ. Baseline human papillomavirus infection, high vaginal parity, and their interaction on cervical cancer risks after a follow-up of more than 10 years. *Cancer Causes Control*. 2012;23(5):703–8.
4. Yetimallar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285(3):805–10.
5. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol*. 2011 Jan 1;6(1):45–57.
6. Paaso A, Koskimaa H-M, Welters MJ, Grénman S, Syrjänen K, van der Burg SH, et al. Cell mediated immunity against HPV16 E2, E6 and E7 peptides in women with incident CIN and in constantly HPV-negative women followed-up for 10-years. *J Transl Med*. 2015;13(1):1–11.
7. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370(9590):890–907.
8. Wheeler CM. The Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infections and Cervical Cancer. Gaps in Knowledge and Future Horizons. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. Elsevier Inc; 2013. p. 165–76.

9. WHO. WHO | Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer [Internet]. World Health Organization; 2015 [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
10. De Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, Do Amaral CMM. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecol Oncol*. Elsevier Inc.; 2012;126(2):304–11.
11. Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2010;116(1):177–85.
12. Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):553–60.
13. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol J*. BioMed Central Ltd; 2011;8(1):269.
14. Galloway DA, Laimins LA. Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Curr Opin Virol*. Elsevier B.V.; 2015 Oct;14:87–92.
15. IARC. International Agency for Research on Cancer: A Review of Human Carcinogens: Biological Agents [Internet]. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012. 255-296 p. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/index.php>
16. IARC Screening Group. Chapter 1: An introduction to the anatomy of the uterine cervix [Internet]. *Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginner's Manual*. [cited 2016 Feb 28]. p. 1–12. Available from: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=1&chap=1>
17. Huh WK. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstet Gynecol*. 2009;114(1):139–43.

18. IARC Screening Group. Chapter 2: An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) [Internet]. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Beginner's Manual. [cited 2016 Feb 28]. p. 13–20. Available from: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=1&chap=1>
19. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RRF, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MADS, et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. *Infect Agent Cancer. Infectious Agents and Cancer*; 2015;10(1):16.
20. Chan PKS, Chang AR, Yu MY, Li W, Chan MYM, Yeung ACM, et al. Age distribution of human papillomavirus infection and cervical neoplasia reflects caveats of cervical screening policies. *Int J Cancer*. 2010 Jan 1;126(1):297–301.
21. Tjalma W a, Fiander A, Reich O, Powell N, Nowakowski AM, Kirschner B, et al. Differences in human papillomavirus type distribution in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2013;132(4):854–67.
22. van der Marel J, Berkhof J, Ordi J, Torné A, Del Pino M, van Baars R, et al. Attributing Oncogenic Human Papillomavirus Genotypes to High-grade Cervical Neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(4):496–504.
23. IARC. Human Papillomaviruses [Internet]. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2007. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-6.pdf>
24. Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol*. 2005;105(1):174–81.
25. Roura E, Castellsagué X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort.

- Int J Cancer. 2014;135(2):453–66.
26. Gadducci A, Barsotti C, Cosio S, Domenici L, Riccardo Genazzani A. Smoking habit, immune suppression, oral contraceptive use, and hormone replacement therapy use and cervical carcinogenesis: a review of the literature. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27(8):597–604.
 27. Kapeu AS, Luostarinen T, Jellum E, Dillner J, Hakama M, Koskela P, et al. Is smoking an independent risk factor for invasive cervical cancer? A nested case-control study within Nordic biobanks. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):480–8.
 28. Mcintyre-seltman K, Castle PE, Guido R, Schiffman M, Wheeler CM, Group A. Smoking Is a Risk Factor for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 among Oncogenic Human Papillomavirus DNA – Positive Women with Equivocal or Mildly Abnormal Cytology. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 2005;14(5):1165–71.
 29. Louie KS, Castellsague X, De Sanjos S, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, et al. Smoking and passive smoking in cervical cancer risk: Pooled analysis of couples from the IARC multicentric case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(7):1379–90.
 30. Gunnell AS, Tran TN, Torrang A, Dickman PW, Sparenn P, Palmgren J, et al. Synergy between cigarette smoking and human papillomavirus type 16 in cervical cancer in situ development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(11):2141–7.
 31. Xi LF, Koutsky LA, Castle PE, Edelstein ZR, Meyers C, Ho J, et al. Relationship between cigarette smoking and human papilloma virus types 16 and 18 DNA load. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(12):3490–6.
 32. Oh HY, Kim MK, Seo S-S, Lee J-K. Association of Combined Tobacco Smoking and Oral Contraceptive Use With Cervical Intraepithelial Neoplasia 2 or 3 in Korean Women. *J Epidemiol.* 2016;1–8.

33. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. *Cancer Sci.* 2010;101(9):2065–73.
34. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and Cervical Cancer. *ISRN Obstet Gynecol.* 2011;2011:1–6.
35. Collins S, Rollason TP, Young LS, Woodman CBJ. Cigarette smoking is an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia in young women: A longitudinal study. *Eur J Cancer.* Elsevier Ltd; 2010 Jan;46(2):405–11.
36. Vaccarella S, Herrero R, Snijders PJF, Dai M, Thomas JO, Hieu NT, et al. Smoking and human papillomavirus infection: Pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *Int J Epidemiol.* 2008;37(3):536–46.
37. Appleby P, Beral V, Berrington De González A, Colin D, Franceschi S, Goodill A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: Collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006;118(6):1481–95.
38. Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(10):723–35.
39. Simen-Kapeu A, La Ruche G, Kataja V, Yliskoski M, Bergeron C, Horo A, et al. Tobacco smoking and chewing as risk factors for multiple human papillomavirus infections and cervical squamous intraepithelial lesions in two countries (Côte d’Ivoire and Finland) with different tobacco exposure. *Cancer Causes Control.* 2009;20(2):163–70.
40. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Castellsague X. The Influence of

- Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS One*. 2016;(January 25):1–17.
41. Rinaldi S, Plummer M, Biessy C, Castellsagué X, Overvad K, Kjær SK, et al. Endogenous sex steroids and risk of cervical carcinoma: Results from the EPIC study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(12):2532–40.
 42. Chih HJ, Lee AH, Colville L, Xu D, Binns CW. Condom and oral contraceptive use and risk of cervical intraepithelial neoplasia in Australian women. *J Gynecol Oncol*. 2014;25(3):183–7.
 43. Appleby P, Beral V, Berrington de González A, Colin D, Franceschi S, Goodhill A, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet*. 2007;370(9599):1609–21.
 44. Jaakkola S, Pukkala E, K.lyytinen H, Ylikorkala O. Postmenopausal estradiol-progestagen therapy and risk for uterine cervical cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(4).
 45. Castle PE, Walker JL, Schiffman M, Wheeler CM. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer*. 2005;117(6):1007–12.
 46. Longatto-Filho A, Hammes LS, Sarian LO, Roteli-Martins C, Derchain SFM, Eren M, et al. Hormonal contraceptives and the length of their use are not independent risk factors for high-risk HPV infections or high-grade CIN. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;71(2):93–103.
 47. Syrjanen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J, et al. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*.

- 2006;26(6C):4729–40.
48. La Vecchia C, Boccia S. Oral contraceptives, human papillomavirus and cervical cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23(2):110–2.
 49. Jensen KE, Schmiedel S, Norrild B, Frederiksen K, Iftner T, Kjaer SK. Parity as a cofactor for high-grade cervical disease among women with persistent human papillomavirus infection: a 13-year follow-up. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2013;108(1):234–9.
 50. Trottier H, Mayrand M-H, Baggio ML, Galan L, Ferenczy A, Villa LL, et al. Risk of Human Papillomavirus (HPV) Infection and Cervical Neoplasia after Pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth.* BMC Pregnancy and Childbirth; 2015;15(1):244.
 51. Rajkumar T, Cuzick J, Appleby P, Barnabas R, Beral V, Berrington De González A, et al. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1108–24.
 52. Serati M, Uccella S, Laterza RM, Salvatore S, Beretta P, Riva C, et al. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(12):1296–300.
 53. Nguyen ML, Flowers L. Cervical Cancer Screening in Immunocompromised Women. *Obstet Gynecol Clin North Am.* Elsevier Inc; 2013;40(2):339–57.
 54. Dugue P-A, Rebolj M, Garred P, Lynge E. Immunosuppression and risk of cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(1):29–42.
 55. Meeuwis K a P, van Rossum MM, van de Kerkhof PCM, Hoitsma AJ, Massuger LF a G, de Hullu J a. Skin cancer and (pre)malignancies of the female genital tract in renal transplant recipients. *Transpl Int.* 2010 Feb;23(2):191–9.
 56. Klumb EM, Araujo ML, Jesus GR, Santos DB, Oliveira A V, Albuquerque EMN, et al.

- Is higher prevalence of cervical intraepithelial neoplasia in women with lupus due to immunosuppression? *J Clin Rheumatol*. 2010;16(4):153–7.
57. Tam L-S, Chan PKS, Ho SC, Yu M-Y, Yim S-F, Cheung T-H, et al. Risk factors for squamous intraepithelial lesions in systemic lupus erythematosus: A prospective cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2011 Feb;63(2):269–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890985>
 58. Lees CW, Critchley J, Chee N, Beez T, Gailer RE, Williams AR, et al. Lack of association between cervical dysplasia and IBD: A large case-control study. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(11):1621–9.
 59. Singh H, Demers AA, Nugent Z, Mahmud SM, Kliwer E V., Bernstein CN. Risk of Cervical Abnormalities in Women With Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Nested Case-Control Study. *Gastroenterology*. AGA Institute American Gastroenterological Association; 2009;136(2):451–8.
 60. Kane S, Khatibi B, Reddy D. Higher incidence of abnormal Pap smears in women with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(3):631–6.
 61. Massad LS, Seaberg EC, Wright RL, Darragh T, Lee Y-C, Colie C, et al. Squamous Cervical Lesions in Women With Human Immunodeficiency Virus. *Obstetrics Gynecol*. 2008;111(6):1388–93.
 62. Denny L, Boa R, Williamson A-L, Allan B, Hardie D, Stan R, et al. Human papillomavirus infection and cervical disease in human immunodeficiency virus-1-infected women. *Obstet Gynecol*. 2008;111(6):1380–7.
 63. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(8):577–86.
 64. Clifford GM, Franceschi S, Keiser O, Schöni-Affolter F, Lise M, Dehler S, et al.

- Immunodeficiency and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 2/3 and cervical cancer: A nested case-control study in the Swiss HIV cohort study. *Int J Cancer*. 2016 Apr 1;138(7):1732–40.
65. Keller MJ, Burk RD, Xie X, Anastos K, Massad LS, Minkoff H, et al. Risk of Cervical Precancer and Cancer Among HIV-Infected Women With Normal Cervical Cytology and No Evidence of Oncogenic HPV Infection. *JAMA*. 2012 Jul 25;308(4):362–9.
66. Abraham AG, D'Souza G, Jing Y, Gange SJ, Sterling TR, Silverberg MJ, et al. Invasive Cervical Cancer Risk Among HIV-Infected Women: A North American multi-cohort collaboration prospective study. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;62(4):405–13.
67. Massad LS, Seaberg EC, Watts DH, Minkoff H, Levine AM, Henry D, et al. Long-term incidence of cervical cancer in women with human immunodeficiency virus. *Cancer*. 2009 Feb 1;115(3):524–30.
68. Denny LA, Franceschi S, de Sanjosé S, Heard I, Moscicki AB, Palefsky J. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2012;30(SUPPL.5):F168–74.
69. Gharvey J, Kovacs A, Burk RD, Stewart Massad L, Minkoff H, Xie X, et al. Genital tract HIV RNA levels and their associations with human papillomavirus infection and risk of cervical precancer. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014;66(3):316–23.
70. Huchko MJ, Woo V, Liegler T, Leddy A, Smith-McCune K, Sawaya G, et al. Is there an association between HIV-1 genital shedding and cervical intraepithelial neoplasia 2/3 among women on antiretroviral therapy? *J Low Genit Tract Dis*. 2013;17(3):354–60.
71. Roccio M, Dal Bello B, Gardella B, Carrara M, Gulminetti R, Mariani B, et al. HPV infection and intraepithelial lesions: comparison between HIV positive and negative women. *Curr HIV Res*. 2012;10(7):614–9.

72. Naucler P, Mabota da Costa F, da Costa JL, Ljungberg O, Bugalho a., Dillner J. Human papillomavirus type-specific risk of cervical cancer in a population with high human immunodeficiency virus prevalence: case-control study. *J Gen Virol.* 2011;92(2011):2784–91.
73. De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(6):545–54.
74. Castellsagué X, Pawlita M, Roura E, Margall N, Waterboer T, Bosch FX, et al. Prospective seroepidemiologic study on the role of Human Papillomavirus and other infections in cervical carcinogenesis: Evidence from the EPIC cohort. *Int J Cancer.* 2014;135(2):440–52.
75. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro MEL, Barcellos RB, et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(2):106–13.
76. Paba P, Bonifacio D, Di Bonito L, Ombres D, Favalli C, Syrjänen K, et al. Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways. *Intervirology.* 2008;51(4):230–4.
77. Bellaminutti S, Seraceni S, De Seta F, Gheit T, Tommasino M, Comar M. HPV and Chlamydia trachomatis co-detection in young asymptomatic women from high incidence area for cervical cancer. *J Med Virol.* 2014;86(11):1920–5.
78. Silins I, Ryd W, Strand A, Wadell G, Törnberg S, Hansson BG, et al. Chlamydia trachomatis infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer.* 2005;116(1):110–5.
79. Lehtinen M, Ault KA, Lyytikäinen E, Dillner J, Garland SM, Ferris DG, et al. Chlamydia

- trachomatis infection and risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Sex Transm Infect.* 2011;87(5):372–6.
80. Safaeian M, Quint K, Schiffman M, Rodriguez AC, Wacholder S, Herrero R, et al. Chlamydia trachomatis and risk of prevalent and incident cervical premalignancy in a population-based cohort. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(23):1794–804.
81. Cao S, Gan Y, Dong X, Lu Z. Herpes simplex virus type 2 and the risk of cervical cancer: a meta-analysis of observational studies. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(6):1059–66.
82. Silva J, Cerqueira F, Medeiros R. Chlamydia trachomatis infection: Implications for HPV status and cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289(4):715–23.
83. Donders GGG, Depuydt CE, Bogers JP, Vereecken AJ. Association of *Trichomonas vaginalis* and cytological abnormalities of the cervix in low risk women. *PLoS One.* 2013;8(12):1–5.
84. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11(November 2015):10.
85. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, Verhelst R, de Sutter P, Temmerman M, et al. Association between Bacterial Vaginosis and Cervical Intraepithelial Neoplasia: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2012;7(10).
86. Moore EE, Wark JD, Hopper JL, Erbas B, Garland SM. The roles of genetic and environmental factors on risk of cervical cancer: a review of classical twin studies. *Twin Res Hum Genet.* 2012;15(1):79–86.
87. Wang SS, Bratti MC, Rodríguez AC, Herrero R, Burk RD, Porras C, et al. Common Variants in Immune and DNA Repair Genes and Risk for Human Papillomavirus Persistence and Progression to Cervical Cancer. *J Infect Dis.* 2009;199(1):20–30.
88. Wang SS, Gonzalez P, Yu K, Porras C, Li Q, Safaeian M, et al. Common genetic variants

- and risk for HPV persistence and progression to cervical cancer. *PLoS One*. 2010;5(1):1–7.
89. Hosono S, Kawase T, Matsuo K, Watanabe M, Kajiyama H, Hirose K, et al. HLA-A alleles and the risk of cervical squamous cell carcinoma in Japanese women. *J Epidemiol*. 2010;20(4):295–301.
 90. Chen D, Juko-Pecirep I, Hammer J, Ivansson E, Enroth S, Gustavsson I, et al. Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(9):624–33.
 91. Bortolotti D, Gentili V, Rotola A, Di Luca D, Rizzo R. Implication of HLA-G 3' untranslated region polymorphisms in human papillomavirus infection. *Tissue Antigens*. 2014;83(2):113–8.
 92. Liu Y, Zhang J, Jia Z, Li J, Dong C, Li Y. The correlation between HLA-DRB1 and HLA-DQB1 gene polymorphisms and cytokines in HPV16 infected women with advanced cervical cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):11490–5.