MARIA TERESA RONCAGLIA

**Valor da captura híbrida para o papilomavírus humano (HPV) no
seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino
devido a lesão intraepitelial de alto grau por
cirurgia de alta frequência (CAF)**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Roncaglia, Maria Teresa

Valor da captura híbrida para papilomavírus humano (HPV) no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino devido a lesão intraepitelial de alto grau por cirurgia de alta frequência (CAF) / Maria Teresa Roncaglia. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Adhemar Longatto Filho.

Descritores: 1.Conização 2.Colo do útero 3.Marcadores biológicos 4.Sonda de DNA de HPV 5.Captura híbrida de HPV 6.Seguimentos

USP/FM/DBD-097/12

Dedicatória

Aos meus pais, **Ettore José** e **Elisabeth**, pelo amor incondicional,
apoio e estímulo constantes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, **Ana Maria**, **Maria Paula** e **João Luis**,
por estarem sempre presentes e personificarem todos os bons
valores que uma verdadeira família deve ter.

Ao meu cunhado, **Ricardo**, por fazer da nossa família, sua família.

Aos meus sobrinhos, **Otávio** e **Alice**, por tornarem minha vida
mais divertida e completa.

Agradecimientos

Ao meu orientador, **Professor Doutor Adhemar Longatto Filho**, sem o qual esse trabalho não seria possível.

Ao **Doutor Eduardo Vieira da Motta**, idealizador inicial dessa jornada.

À **Doutora Maricy Tacla**, pelo incentivo constante e sugestões inestimáveis.

Ao **Professor Doutor Edmund Chada Baracat**, pelos conselhos e orientações durante todo o processo.

À **Doutora Eleonora Flosi Stoccheri Fonseca**, por ser a melhor metade da nossa dupla de residência.

À **Doutora Thaís Vilella Peterson**, por dividir comigo as alegrias e tristezas da preceptoria.

À **Doutora Carolina Corsini Steiner**, que esteve ao meu lado no início deste projeto, ajudando-me na coleta de dados e me estimulando a vencer as dificuldades que surgiram diariamente.

Às **Doutoras Diana Vanni, Márcia Tubaki e Yuko Nakano**, pelo apoio, risadas e convivência.

Ao **Doutor José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani**, pela ajuda com a análise estatística dos dados coletados e valiosas sugestões de aprimoramento da tese.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos**, pelo auxílio na realização dos testes imuno-histoquímicos.

Ao **Professor Doutor Venâncio Avancini Ferreira Alves** e ao **Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP**, pela ajuda e suporte na obtenção das peças cirúrgicas utilizadas nessa tese.

Ao **Laboratório de Investigação Médica – 14 (LIM 14)**, pelo suporte técnico oferecido.

*“Se você não pode explicar de uma maneira simples,
você não entendeu bem o suficiente.”*

(Albert Einstein, 1879-1955)

Normalização adotada

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*

.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
Geral	5
Específicos	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 Papilomavírus humano (HPV)	7
3.2 Oncoproteína E6	9
3.3 Oncoproteína E7 e p16	11
3.4 Colpocitologia oncológica e colposcopia	14
3.5 Captura híbrida para HPV	17
3.6 Tratamento	19
3.7 HPV e alterações glandulares	21
4 MÉTODOS	23
4.1 Pacientes	24
4.1.1 Descrição da casuística	25
4.2 Colposcopia	26
4.3 Procedimento cirúrgico	26
4.4 Captura híbrida para HPV de alto risco	28
4.5 Testes imuno-histoquímicos	29
4.5.1 Desparafinização e Reidratação	30
4.5.2 Reação imuno-histoquímica de p16	30
4.5.2.1 Recuperação antigênica	30
4.5.2.2 Bloqueio das peroxidases endógenas	31
4.5.2.3 Anticorpo primário	31
4.5.2.4 Amplificação da marcação	31
4.5.2.5 Revelação com DAB	32
4.5.3 Reação imuno-histoquímica do E6	32
4.5.3.1 Recuperação antigênica	32

Listas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
AGC	Atipia celular glandular
ASC	Atipia de significado indeterminado
ASC-H	Atipia de significado indeterminado, não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASC-US	Atipia de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica
Bx	Biópsia
CAF	Cirurgia de alta frequência
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCO	Colpocitologia oncótica
CH	Captura híbrida
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dp	Desvio padrão
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kb	Quilobase
kD	Quilodawton
LIEAG	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

LIEBG	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
ml	Mililitro
mM	Milimol
NCI	“National Cancer Institute”
NIC 1	Neoplasia intraepitelial cervical grau 1
NIC 2	Neoplasia intraepitelial cervical grau 2
NIC 3	Neoplasia intraepitelial cervical grau 3
pRb	Proteína supressora de tumor do retinoblastoma
PTGI	Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Ácido ribonucleico
TLR	“Toll-like receptors”
USA	“United States of America”
μL	Microlitro

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Dados descritivos da população estudada (Setor de PTGI da Divisão da Clínica Ginecológica do HC-FMUSP – Março de 2006 a Maio de 2009).....	25
Tabela 2 -	Achados citológicos e histológicos anteriores ao tratamento (Ambulatório de PTGI do HC-FMUSP – março de 2006 a maio de 2009).....	39
Tabela 3 -	Achados colposcópicos e exame anatomopatológico da peça cirúrgica.....	40
Tabela 4 -	Frequência dos achados histológicos da peça cirúrgica e avaliação das margens cirúrgicas	41
Tabela 5 -	Resultados dos testes de captura híbrida para HPV prévia ao tratamento, imuno-histoquímica para E6 e p16 na peça cirúrgica	42
Tabela 6 -	Tabagismo e teste imuno-histoquímico para E6 na peça cirúrgica.....	43
Tabela 7 -	Expressão das proteínas p16 e E6	44
Tabela 8 -	Resultados da expressão da proteína p16 e exame anatomopatológico do CAF.....	45
Tabela 9 -	Características da população com seguimento completo e seguimento parcial após o tratamento	46
Tabela 10 -	Descrição das pacientes com citologia alterada após 24 meses do procedimento cirúrgico.....	47
Tabela 11 -	Descrição de intercorrências durante o estudo	49
Tabela 12 --	Comprometimento das margens cirúrgicas e resultado da citologia em qualquer momento do seguimento.....	50
Tabela 13 -	Relação entre a expressão da oncoproteína E6 na peça cirúrgica e alterações citológicas durante o seguimento pós-cirúrgico das pacientes	51
Tabela 14 -	Relação da expressão da proteína p16 na peça cirúrgica e alterações citológicas durante o seguimento pós-tratamento cirúrgico.....	52
Tabela 15 -	Resultado da CH e resultado da citologia em qualquer momento do seguimento completo após o tratamento cirúrgico.....	53

Tabela 16 -	Acurácia da CH nos quatro momentos do seguimento	54
Tabela 17 -	Comparação entre a CH do primeiro retorno com a citologia do quarto retorno	55

Resumo

Resumo

Roncaglia MT. *O valor da captura híbrida para o papilomavírus humano (HPV) no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino devido a lesão intraepitelial de alto grau por cirurgia de alta frequência (CAF)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: A lesão intraepitelial cervical de alto grau causada pelo HPV, precursora do câncer cervical, é facilmente diagnosticada e seu tratamento pode ser realizado de maneira ambulatorial, sem muitas complicações. Mesmo assim, o seguimento das pacientes tratadas deve ser feito de maneira criteriosa e sistemática para que a recorrência ou persistência da doença não passe despercebida. Conseguir identificar o grupo de pacientes com maior probabilidade de recorrência ou persistência da doença facilitaria sobremaneira esse seguimento, diminuindo o ônus econômico e psicológico que o seguimento generalizado produz. O objetivo deste trabalho é identificar marcadores que possam indicar o grupo de pacientes com maior possibilidade de recorrência da lesão intraepitelial cervical de alto grau. **MÉTODOS:** Neste estudo 114 mulheres com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau foram submetidas à conização cervical por cirurgia de alta frequência (CAF) no Setor de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI) da Divisão da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período entre março de 2006 e maio de 2009. O seguimento foi realizado a cada seis meses durante o período de 24 meses. No seguimento foi coletada a citologia cervical, captura híbrida para HPV e realizada a colposcopia. Foram avaliados os testes de captura híbrida para HPV coletadas durante o seguimento, imuno-histoquímicos para oncoproteína viral E6 e proteína p16 na peça cirúrgica como possíveis marcadores de recorrência. **RESULTADOS:** A avaliação anatomopatológica da peça cirúrgica diagnosticou 85 (74,6%) casos de lesão intraepitelial cervical de alto grau e 29 (25,4%) casos de lesão intraepitelial de baixo grau. Nessas peças, 45 (39,5%) apresentaram expressão positiva para oncoproteína E6 e 69 (60,5%) apresentaram expressão negativa para E6; 74 (64,9%) apresentaram expressão positiva para p16 e 40 (35,1%) apresentaram expressão negativa para p16. A oncoproteína E6 não se associou com a apresentação mais grave da doença. Já a proteína p16 esteve positiva em 68 (80%) casos diagnosticados como lesão intraepitelial de alto grau e negativa em 23 (79,3%) casos com diagnóstico anatomopatológico de lesão intraepitelial de baixo grau ou cervicite crônica. A CH coletada no primeiro retorno apresentou sensibilidade de 83,3%, especificidade de 87,8%, VPP de 50% e VPN de 97,3%. Comparando a CH coletada no primeiro retorno com a citologia coletada após os 24 meses de seguimento, a CH apresentou sensibilidade de 75%, especificidade de 83,1%, VPP de 20% e VPN de 98,3%. **CONCLUSÕES:** A expressão das oncoproteína E6 e proteína p16 na peça cirúrgica não demonstraram ter valor para predizer recorrência no seguimento de pacientes tratadas por lesão intraepitelial cervical de alto grau, mesmo a p16 estando associada à presença de lesões mais graves. A CH pode ser usada como um teste preditivo de recorrência durante o seguimento de pacientes tratadas por lesão intraepitelial de alto grau. O VPN do teste é bastante alto e seu resultado negativo, seis meses após o tratamento indica uma taxa baixíssima de recorrência da doença.

Descritores: 1. Conização 2. Colo do útero 3. Marcadores biológicos 4. Sonda de DNA de HPV 5. Captura híbrida de HPV 6. Seguintos

Summary

Summary

Roncaglia MT. *The value of the HPV DNA test on the follow-up of the patients treated for high grade cervical intraepithelial lesions by conization with large loop excision of the transformation zone (LLETZ)* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

INTRODUCTION: The high grade cervical intraepithelial lesion caused by HPV, a pre-malignant condition, is easily diagnosed and its treatment can be done in outpatients without many complications. Nevertheless the patients follow-up must be done in a very systematic way to avoid any recurrence or persistence of the disease. To be able to identify the group of patients with higher rate of recurrence or persistence of the disease would make this follow-up much easier and decrease the economic and psychological burden of stressed outcome. The goal of our study is to identify markers that could indicate the group of patients more likely to recur.

METHODS: In this study, 114 women diagnosed with high grade cervical intraepithelial lesion were treated with LLETZ at the Discipline of Gynecology, Faculty of Medicine, São Paulo University from March 2006 and May 2009. The follow-up visits after the treatment included Pap smear, HPV DNA test and colposcopy and occurred every 6 months for 24 months. The markers evaluated were the HPV DNA test collected during the follow-up and immunohistochemical tests performed on the surgical specimen: E6 oncoprotein and protein p16.

RESULTS: We found 85 cases (74,6%) of HSIL and 29 cases (25,4%) of LSIL in the surgical specimen obtained with the LLETZ. The E6 oncoprotein was expressed in 45 (39,5%) and not expressed in 69 (60,5%) of the specimen; 74 (64,9%) expressed p16 and 40 (35,1%) didn't express p16. The E6 oncoprotein was not associated with severe presentation of the disease. The protein p16 was positive in 68 (80%) cases of diagnosed HSIL and negative in 23 (79,3%) cases with diagnosed LSIL or chronic cervicitis. The HPV DNA test collected at the first follow-up consult at 6 months presented a sensitivity of 83,3% specificity of 87,8%, positive predictive value (PPV) of 50% and negative predictive value (NPV) of 97,3%. Comparing the HPV DNA test collected at the first follow-up visit and the cervical cytology collected at the fourth and last follow-up visit at 24 months, the HPV DNA test presented a sensitivity of 75%, specificity of 83,1%, PPV of 20% and NPV of 98,3%.

CONCLUSIONS: The E6 oncoprotein and protein p16 expression on the surgical specimen were not able to predict recurrence of the disease during the follow-up of the patients. The HPV DNA test can be used as a marker of the recurrence on the follow-up of patients treated for HSIL with LLETZ. The HPV DNA test negative result at the 6 month follow-up visit represents an extremely low recurrence rate.

Descriptors: 1. Conization 2. Cervix uteri 3. Biological markers 4. DNA probes, HPV 5. HPV Hybrid capture 6. Follow-up studies

1 Introdução

O carcinoma de colo uterino é o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado e a quarta causa de morte por câncer em mulheres no mundo, sendo responsável por 9% de todos os casos novos e 8% das mortes em mulheres no mundo, no ano de 2008 ^(1, 2). O “National Cancer Institute” (NCI) americano estimou que 12.200 mulheres seriam diagnosticadas com câncer de colo uterino no ano de 2010 e que 4.210 morreriam devido ao câncer cervical durante esse ano ⁽³⁾.

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, INCA, a estimativa para o ano de 2010 previa o diagnóstico de 18.430 novos casos de câncer de colo de útero ⁽⁴⁾. No país, essa entidade é segundo tipo de câncer mais incidente nas mulheres, excetuando-se o câncer de pele, sendo precedido apenas pelo câncer de mama ⁽⁴⁾. No Estado de São Paulo a estimativa de incidência do câncer de colo uterino nas mulheres foi de 3.190 casos novos no ano de 2010, o terceiro mais prevalente, excetuando-se o câncer de pele, sendo precedido pelos carcinomas de mama, cólon e reto ⁽⁴⁾.

Em relação à taxa de sobrevida em cinco anos, ela varia entre 51% a 70% em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento, essa taxa é mais baixa, atingindo 41% de sobrevida em cinco anos ⁽⁵⁾.

Já foram identificados mais de cem tipos do vírus do papiloma humano (HPV) ⁽⁶⁾ e eles são divididos em dois grupos: oncogênico, ou de alto risco de malignidade, e não oncogênico, ou de baixo risco de malignidade. O grupo oncogênico está associado à elevação do risco para o surgimento de câncer cervical e

os principais representantes deste grupo são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. Já os principais representantes do grupo não oncogênico são os HPV tipo 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 e não estão associados à elevação do risco para o desenvolvimento da neoplasia cervical ⁽⁷⁾.

Mais de 70% dos casos de câncer cervical no mundo são causados pelo HPV 16 ou 18, sendo o HPV 16 o mais comum, responsável por 55% dos casos, seguido pelo HPV 18, responsável por 15% dos casos de câncer cervical ⁽⁸⁾. Essa proporção é mantida em todos os continentes, inclusive na América do Sul, onde os HPV 16 e 18 são responsáveis por 65% - 70% dos casos de neoplasia cervical ⁽⁸⁾.

Sabe-se que, para que haja o surgimento do câncer de colo uterino, é necessária a presença da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) do tipo oncogênico ⁽⁹⁾ e sua persistência ^(10, 11).

A detecção do HPV e o reconhecimento das atipias citológicas provocadas por sua permanência na célula hospedeira são reconhecidos parâmetros de valor diagnóstico e prognóstico. Recentemente, marcadores proteicos como a p16 e a proteína oncogênica E6, expressos nas células alteradas pela infecção do HPV, parecem constituir importantes adjuntos para aprimorar a qualidade dessas avaliações.

2 Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar o valor da captura híbrida para a identificação do papilomavírus humano (HPV) oncogênico no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino devido a lesão intraepitelial de alto grau, por cirurgia de alta frequência (CAF).

Objetivos Específicos

- Avaliar a acurácia da captura híbrida para HPV, em comparação ao exame citológico, como marcador de recorrência de lesão intraepitelial de alto grau cervical.
- Avaliar a expressão de p16 e da oncoproteína E6 na peça cirúrgica da conização como marcadores de recorrência da doença.

3 Revisão da Literatura

3.1 Papilomavírus humano (HPV)

O HPV está distribuído por toda a população mundial e é comumente transmitido por meio do contato sexual. A infecção pode causar lesões intraepiteliais escamosas nas mulheres infectadas ⁽¹²⁾. A maior parte das lesões regride em 6-12 meses, provavelmente devido a fatores imunológicos do hospedeiro. Entretanto, uma pequena porcentagem das lesões persiste e progride para formas mais graves, como o carcinoma cervical ^(13, 14) e é esse grupo que mais se beneficia dos testes de rastreamento.

O HPV é um DNA vírus cujo genoma está dividido em três domínios: a região reguladora não codificadora (URR) de 1 kb, a região inicial (“early”) com seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e a região tardia (“late”) que codifica dois genes (L1 e L2) ⁽¹⁵⁾.

A infecção pelo HPV acontece nas células da camada basal do epitélio escamoso cervical, por meio da penetração do vírus por microlesões da pele ou mucosa. A infecção pelo HPV somente ocorre nas células epiteliais que mantêm sua capacidade de proliferação ^(13, 16). O vírus infecta as células próximas à membrana basal do epitélio escamoso cervical e mantém seu genoma por meio de um pequeno número de cópias na forma episomal a partir da expressão dos genes E1 e E2 ⁽¹⁷⁾. Nas células basais a maior parte da expressão viral é suprimida, embora haja a expressão limitada de alguns genes virais iniciais (“early”) como o E5, E6 e E7. A

expressão desses genes resulta no aumento da proliferação das células infectadas e sua expansão lateral no tecido cervical ⁽¹⁴⁾.

No epitélio escamoso cervical não infectado, a célula para de se replicar e entra em diferenciação assim que migra da camada basal para a camada parabasal ⁽¹⁵⁾. Quando ocorre a migração das células da camada celular basal para a suprabasal, inicia-se a expressão gênica viral tardia (“late”) como L1 e L2, o genoma circular viral é replicado e as proteínas estruturais são formadas. Quando as células atingem a camada superficial da mucosa ou da pele, partículas virais completas são formadas e liberadas ⁽¹⁴⁾. Geralmente o DNA do HPV localiza-se no citoplasma ou em sua forma episomal. A falha na expressão do gene E1 faz com que o vírus perca a sua forma episomal, integrando o genoma do hospedeiro e é isso que ocorre quando há a progressão da doença.

Nos casos das transformações malignas, foi descrita a integração do DNA viral com o genoma do hospedeiro ⁽¹⁸⁾. Durante a integração viral ocorre a quebra da região onde se encontram os genes E1 e E2, levando à sua perda. A região do gene E2 codifica proteínas inibidoras da transcrição das oncoproteína E6 e E7 e, com sua perda, essa inibição é suspensa, resultando no aumento descontrolado da expressão das proteínas oncogênicas E6 e E7. As oncoproteínas E6 e E7 impedem a progressão do ciclo celular e a diferenciação celular normal é retardada ⁽¹⁹⁾, evento necessário para a replicação viral ⁽²⁰⁾. A expressão descontrolada de E6 e E7 leva à transformação maligna das células do hospedeiro e à formação tumoral ⁽²¹⁾.

Foi demonstrado que apenas os genes E6 e E7 dos tipos oncogênicos de HPV têm capacidade de imortalizar células humanas em culturas de tecidos ⁽²²⁾. Os oncogenes E6 e E7 interagem com o gene supressor de tumor do hospedeiro p53 e

pRb, respectivamente, levando à inibição da apoptose celular e subsequente aumento da replicação das células transformadas ⁽²³⁾. Essas duas condições são importantes para o início dos eventos celulares que resultam na imortalização celular e eventual transformação maligna. A expressão de E6 e E7 é invariável nos casos de carcinoma cervical ⁽¹⁴⁾.

A evolução para o câncer cervical ocorre somente com a infecção persistente do HPV de alto risco ⁽⁹⁾ e é reconhecido como um desfecho raro de uma infecção muito comum transmitida sexualmente ⁽²⁴⁾. O DNA do HPV pode ser identificado na quase totalidade dos casos invasivos da doença e na maior parte dos casos das doenças precursoras ⁽²⁵⁾.

3.2 Oncoproteína E6

A proteína E6 tem aproximadamente 150 aminoácidos e peso molecular de 18 kD. Ela se liga ao supressor de tumor p53, impedindo a apoptose celular ⁽¹⁹⁾.

O p53 é um gene supressor de tumor normalmente presente em baixos níveis e inativo. O p53 é ativado e tem sua expressão aumentada com a injúria celular. Uma vez ativado, o p53 inicia o processo de reparação do DNA celular, inibindo o ciclo celular ou desencadeando a apoptose a depender da extensão do dano da célula. A ativação do p53 também ocorre quando há estimulação inadequada da síntese de DNA celular, como nas infecções pelo HPV ⁽²⁶⁾.

O principal mecanismo pelo qual a proteína E6 inativa o p53 é por meio de sua degradação ^(27, 28). As proteínas E6 dos HPVs de alto risco ligam-se à região central do p53, levando à sua degradação ⁽²⁹⁾.

Além de degradar o p53, a proteína E6 também interage com ele, inibindo sua ligação com o DNA celular e desfazendo as ligações já formadas, bloqueando a função ^(30, 31).

Outro mecanismo proposto de ação de inibição do p53 pela proteína E6 é o sequestro do p53 no citoplasma. O deslocamento do p53 nuclear foi demonstrado em experimento, utilizando-se células cervicais nas quais a degradação do p53 pela proteína E6 estava bloqueada. Mesmo com os níveis de p53 normais, a localização nuclear do p53 estava alterada e sua função, inibida ⁽³²⁾.

A apoptose celular também é alterada pela oncoproteína E6. A apoptose apresenta duas vias: extrínseca e intrínseca. A proteína E6 age nessas duas vias ⁽²⁶⁾. Na via extrínseca ocorre a ativação de receptores da membrana celular responsáveis pela morte celular. Essa ativação é induzida por sinais extracelulares de dano celular. A proteína E6 bloqueia esses receptores impedindo o início da cadeia de reações que levaria à morte da célula. Na via intrínseca o sinal que desencadeia o processo se origina dentro da célula e leva à formação de poros nas membranas mitocondriais celulares com a liberação das proteínas mitocondriais para dentro do citoplasma, iniciando o processo da morte celular. A proteína E6 bloqueia formação desses poros mitocondriais inibindo a apoptose ⁽²⁶⁾.

Outra atividade da proteína E6 é a ativação da telomerase, enzima que produz o alongamento do telômero celular nas células epiteliais, capacidade esta independente da inativação do p53⁽³³⁾.

O DNA celular é replicado em cada divisão e durante esse processo aproximadamente 150-200 nucleotídeos são perdidos na região terminal do cromossomo. Para evitar que haja perda de informação genética importante nos cromossomos durante esse processo, a região terminal do cromossomo é protegida por uma sequência repetitiva de DNA não codificante chamada telômero, que serve para manter a estabilidade estrutural do cromossomo. Com as sucessivas divisões celulares, a região do telômero é encurtada e isso sinaliza à célula para entrar em senescência⁽³⁴⁾.

A telomerase é a proteína que expande a região telomérica nos cromossomos. Ela normalmente se apresenta ativa em células-tronco e no desenvolvimento embrionário, mas inativa nas células somáticas⁽²⁶⁾. A proteína E6 ativa a telomerase nas células epiteliais perpetuando, desse modo, a divisão celular que seria naturalmente interrompida, imortalizando a célula⁽³³⁾.

3.3 Oncoproteína E7 e p16

A oncoproteína viral E7 é encontrada predominantemente no núcleo das células e é composta por aproximadamente cem aminoácidos⁽³⁵⁾. A proteína E7 não apresenta atividade enzimática intrínseca nem atividade específica de ligação ao DNA, e é amplamente aceito que sua atividade biológica esteja relacionada à

habilidade de se associar e alterar os fenômenos normais dos complexos de regulação celular ⁽³⁶⁾.

A oncoproteína E7 liga-se à proteína supressora de tumor do retinoblastoma, pRb, fazendo com que a célula volte a se replicar, replicando também as proteínas virais ⁽¹⁵⁾.

A pRb faz parte da família de proteínas supressoras de tumor do retinoblastoma (pRb, p107 e p130) cuja característica mais conhecida é a habilidade de reprimir a transcrição do gene regulador E2F. O fator de transcrição E2F coordena a expressão temporal de genes necessários para a proliferação celular ⁽³⁷⁾. Interagindo com o E2F, a pRb regula a transição celular da fase G1 para S da interfase, causando a parada do ciclo celular. Este é um dos pontos de checagem do ciclo de divisão celular ⁽³⁸⁾.

A oncoproteína E7 se liga à pRb impedindo a formação do complexo E2F-pRb, fazendo com que a célula entre na fase S na ausência de sinais mitóticos e sem passar continuamente pelo ponto de checagem celular ⁽³⁹⁾. Isso também pode ocorrer a partir da ligação direta da E7 com a E2F ⁽⁴⁰⁾. Além de inibir a ligação da pRb com a E2F, a proteína E7 dos HPVs de alto risco possui capacidade de induzir a degradação de pRb ⁽⁴¹⁾.

A formação do complexo E2F-pRb é ativada por inibidores de ciclinos dependentes, entre eles a p16 ⁽⁴²⁾. Nas células infectadas pelo HPV, a oncoproteína E7 impede a formação do complexo E2F-pRb e, com isso, a expressão da p16 aumenta numa tentativa de estimular a formação do complexo E2F-pRb ⁽⁴³⁾. Como consequência do aumento da expressão, há o acúmulo da p16 dentro das

células^(44, 45). Esse fenômeno ocorre nas fases iniciais da imortalização celular e não nas fases tardias de carcinogênese⁽⁴⁶⁾. O aumento da p16 está relacionado à parada do processo de senescência celular e à desregulação do ciclo celular e não a processos proliferativos⁽⁴⁷⁾; desse modo, pode ser usado como um marcador de lesões pré-malignas⁽⁴²⁾ e indicador de progressão da doença⁽⁴⁸⁾.

Outra propriedade da proteína E7 dos HPVs de alto risco é sua capacidade de promover a instabilidade do genoma. A expressão de E7 é suficiente para induzir o aumento de alterações nos centrôssomos de queratinócitos⁽⁴⁹⁾.

Estudos recentes mostram que as oncoproteínas E6 e E7 também modulam a resposta imunológica inata do hospedeiro representada pelos “toll-like receptors” (TLRs) que são os sensores para a evasão de patógenos. Essas oncoproteínas aparentemente usam dois mecanismos distintos ainda não bem caracterizados para inibir a expressão do TLR9, que é o receptor responsável por identificar sequências de DNA. Essa propriedade parece não estar presente nos HPVs de baixo risco, apenas nos de alto risco⁽⁵⁰⁾.

Todo esse processo ocorre porque, apesar de o HPV só infectar e se replicar em células diferenciadas, ele necessita de fatores de replicação celular que só são encontrados em células em divisão. A consequência de todas essas alterações para criar um ambiente favorável ao vírus é o descontrole total do ciclo celular nas células infectadas e o possível aparecimento do câncer⁽²⁰⁾. Esse processo também diferencia os tipos virais de baixo risco dos de alto risco. Os HPVs de baixo risco de malignidade geralmente se replicam, em níveis mais baixos do epitélio escamoso estratificado, onde os queratinócitos ainda se encontram em divisão. Os HPVs de alto risco de malignidade replicam seu genoma em camadas mais altas do epitélio

escamoso estratificado, local onde os queratinócitos encontram-se em processo de diferenciação terminal, fora do ciclo celular e com o seu maquinário de replicação celular desligado. Com isso os HPVs de alto risco necessitam que suas proteínas E7 sejam mais efetivas na indução da síntese do DNA celular e que as proteínas E6 sejam mais efetivas no bloqueio da resposta do p53 ⁽⁵¹⁾.

3.4 Colpocitologia oncótica e colposcopia

O rastreamento do câncer de colo uterino tem sido baseado na coleta de citologia oncótica do colo uterino e na realização da colposcopia nos casos com alteração citológica. No Brasil não há programas organizados de rastreamento de câncer do colo uterino que atinjam todo o país. Não há ferramentas que garantam um intervalo ideal entre os exames de controles, condição necessária para que se obtenha algum resultado de custo-efetividade favorável ⁽⁵²⁾. Esse rastreamento é feito de maneira oportunista a partir do exame citológico do esfregaço cervical no qual se identificam as alterações e lesões causadas pelo HPV.

A colpocitologia oncótica, ou teste de Papanicolaou, é um exame que consiste na avaliação citológica do esfregaço das células colhidas da ectocérvice e endocérvice. É um teste cuja sensibilidade média mundial é de 50%, podendo chegar a 80% em países desenvolvidos, mas com especificidade de 99,1% para o diagnóstico das alterações causadas pelo HPV ⁽⁵³⁾.

A classificação citológica cervical é feita segundo a nomenclatura citológica brasileira que por sua vez foi baseada no Sistema de Bethesda de 2001 ⁽⁵⁴⁾.

A classificação citológica brasileira divide os achados celulares cervicais em:

- Alterações benignas
- Atipias de significado indeterminado (ASC)
 - Possivelmente não neoplásicas (ASC-US)
 - Não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H)
- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL ou LIEBG)
- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL ou LIEAG)
- Carcinoma invasor
- Alterações glandulares
 - Atipia celular glandular (AGC)
 - Adenocarcinoma “in situ” (AIS)
 - Adenocarcinoma

A colposcopia é utilizada quando há achados positivos na citologia cervical. Durante a colposcopia é possível identificar lesões sugestivas da ação do HPV e realizar a biópsia do tecido para elucidação diagnóstica.

Na realização da colposcopia utiliza-se o ácido acético e a solução de Lugol para a identificação das áreas a serem examinadas por biópsia.

O ácido acético, além de dissolver o muco cervical melhorando a visibilidade, coagula as proteínas citoplasmáticas e nucleares das células escamosas cervicais de maneira transitória e, com isso, as áreas afetadas pelo HPV adquirem um aspecto branco opaco quando comparado ao epitélio rosa pálido normal ^(55, 56).

A solução de Lugol é composta por iodo e serve para identificar glicogênio produzido pelas células maduras da camada intermediária do epitélio cervical. As células infectadas pelo HPV não produzem glicogênio, portanto, não se coram com a solução de Lugol ⁽⁵⁶⁾.

A nomenclatura utilizada para a classificação histopatológica é a sugerida por Richart (1967) ⁽⁵⁷⁾ que divide as lesões de acordo com o comprometimento do tecido cervical afetado na sua espessura:

- Neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1)
 - Acometimento de 1/3 da espessura do tecido cervical
- Neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2)
 - Acometimento de 2/3 da espessura do tecido cervical
- Neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3)
 - Acometimento do tecido cervical em toda a sua espessura, sem comprometimento da membrana basal celular

Fazendo a correspondência dos achados citológicos com os achados histológicos, a LSIL ou LIEBG é representada pelo NIC 1, e a HSIL ou LIEAG é representada pelos NIC 2 e 3.

As lesões intraepiteliais podem ser vistas como um contínuo da mesma doença. Mas como já foi mencionado, apenas uma pequena porcentagem das mulheres infectadas pelo HPV sofrem a progressão para formas mais graves da doença. A taxa de progressão do NIC 3 para o carcinoma invasivo é de 12% enquanto que nos casos de NIC 1 essa progressão é de apenas 1% ⁽⁵⁸⁾.

3.5 Captura híbrida para HPV

Além do teste citológico usado no rastreamento das alterações cervicais sugestivas de HPV existe a pesquisa para o DNA viral. Vários estudos demonstraram que o teste de captura híbrida para o DNA do HPV é mais sensível que a citologia cervical para o rastreamento de lesões de alto risco. A sensibilidade do teste de captura híbrida (CH) para lesões de alto risco é de 94,8%, enquanto que a da citologia é de 81,8% ⁽⁵³⁾. Em relação à especificidade do teste, a CH é menos específica que a citologia. A especificidade do teste é de 93% enquanto que a da citologia é de 99,1% ⁽⁵⁹⁾.

O teste de captura híbrida para identificação de HPV pode ser usado como teste de rastreamento primário, rastreamento secundário e no seguimento de casos tratados por lesão cervical intraepitelial de alto grau. Como rastreamento primário a CH pode ser usada isoladamente ou em combinação com a citologia, em pacientes sem diagnóstico de alteração cervical ^(24, 60).

A pesquisa para o DNA viral é mais sensível que a citologia para a detecção de alterações pré-malignas. Alguns estudos demonstraram que a sensibilidade do teste para DNA de HPV para a detecção de NIC 2 foi de 96% e da citologia de 53%, enquanto que a especificidade do teste foi de 92% e da citologia de 97% ⁽⁶¹⁾. Além de identificar mulheres com doença cervical instalada, a CH identifica aquelas com o risco de desenvolvê-la no período de 3 anos a 10 anos ⁽²⁴⁾.

O teste de captura híbrida para HPV tem um alto valor preditivo negativo (VPN); alguns estudos relatam valores acima de 99% ^(60, 62). O alto VPN significa

intervalos maiores nos programas de rastreio, pois a possibilidade de desenvolver câncer cervical com CH negativa no período de 5 anos a 8 anos é mínima. E se a mulher tiver resultados negativos na citologia e na CH, ela apresentará risco desprezível de desenvolver câncer de colo uterino pelos próximos 10 anos ⁽²⁴⁾.

Devido à alta prevalência da infecção pelo HPV na população e à alta taxa de clareamento viral espontâneo em mulheres jovens, a CH é um bom teste no rastreio para mulheres acima de 30 anos ^(61, 63).

Como teste secundário no rastreamento, a CH é realizada naquelas pacientes que sabidamente apresentam alteração na citologia ou lesão precursora cervical e sua função é complementar o resultado da citologia para selecionar as mulheres que necessitam de tratamento ou substituir exames citológicos seriados no seguimento da alteração citológica ⁽⁶⁰⁾.

Como seguimento de casos de lesão precursora tratados, a CH aumenta a vigilância sobre os possíveis casos de recorrência após o tratamento, permitindo um manejo mais agressivo desses casos ⁽⁶⁰⁾. Não há consenso quanto ao tempo de seguimento de pacientes tratadas por lesão intraepitelial de alto grau. Um indicador preditivo do sucesso do tratamento possibilitaria a diminuição do seguimento dessas pacientes. Os dados atuais sugerem que a CH diagnostica doença residual mais rapidamente, com maior sensibilidade e especificidade semelhante ao seguimento realizado com citologia. O teste negativo da CH após o tratamento excisional da lesão intraepitelial de alto grau é um dos fatores preditivos de cura mais confiáveis já identificados ⁽⁶⁴⁾.

A presença do DNA viral é situação necessária, mas não suficiente para a progressão das lesões de baixo grau e alto grau para o carcinoma cervical; por isso, embora o uso do teste de captura híbrida para o DNA do HPV seja uma importante ferramenta de rastreamento, o teste positivo não significa, necessariamente, a progressão da doença. É nesse contexto que estão inseridos os testes moleculares para E6 viral e p16, proteína supressora de tumor expressa pelo hospedeiro, pretensamente mais específicos para retratarem a doença em atividade. Ambos os marcadores parecem desempenhar um papel complementar significativo nesse sentido, como mencionado anteriormente.

3.6 Tratamento

Em estudos longitudinais sobre a história natural do HPV, o tempo entre a detecção do HPV de alto risco e o desenvolvimento do NIC 3 é de 3 anos a 5 anos⁽⁶⁵⁾; e o desenvolvimento do carcinoma cervical pode levar entre 10 anos e 20 anos⁽⁶⁶⁾. Há, portanto, uma grande janela de oportunidade de tratamento da doença antes que ela se encontre nas fases mais avançadas.

Devem ser tratadas as mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 e 3. As mulheres que apresentam diagnóstico citológico de HSIL sem confirmação histológica por ausência de alteração ao exame colposcópico também podem ser submetidas à elucidação diagnóstica por meio da conização do colo uterino⁽⁶⁷⁾.

O tratamento das lesões intraepiteliais de alto grau, NIC 2 e 3 deve ser feita de maneira excisional, retirando a região comprometida do colo uterino. A excisão

pode ser feita com bisturi ou pela técnica de cirurgia de alta frequência (CAF) ou laser de CO₂ ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾.

O tratamento realizado com CAF oferece algumas vantagens: pode ser realizado ambulatorialmente, apresenta menor morbidade e taxa de sucesso de 98% ⁽⁶⁸⁾, mesmo considerando que possa haver lesão térmica causada pelo calor nas margens da peça cirúrgica em 44% dos casos ⁽⁶⁹⁾.

Alguns fatores estão associados ao risco de recorrência da doença após o tratamento das NICs 2 e 3 por CAF: comprometimento das margens cirúrgicas, grau da doença tratada, idade da paciente, presença ou não do HPV e presença ou não de HIV ⁽⁶⁹⁾.

Quanto à situação das margens, os dados não são claros. A presença de margens livres de doença não é garantia de cura e apenas algumas pacientes com margens comprometidas apresentam citologia alterada no seguimento ^(71, 72). Portanto a situação das margens da peça cirúrgica ressecada não pode ser usada como um fator preditivo seguro da persistência ou recorrência da doença ⁽⁶⁹⁾.

O grau da NIC encontrado na ressecção da peça cirúrgica pode estar relacionado com o risco de recorrência. Pacientes com NIC 3 têm risco maior de doença residual e de recorrência da doença no seguimento ⁽⁷³⁾.

Alguns estudos identificaram a idade como fator independente para persistência ou recorrência da neoplasia intraepitelial cervical. Mulheres acima de 50 anos com margens comprometidas são um grupo com alta taxa de recorrência ⁽⁷⁴⁾.

Muitos estudos descrevem a presença do DNA viral antes do procedimento e depois dele, no seguimento, como um fator preditivo de recidiva. A ausência do DNA viral no seguimento da paciente após a realização do CAF diminui

consideravelmente o risco de persistência e recorrência da doença ^(11, 70, 75, 76), sendo este o melhor marcador de persistência e recorrência da NIC atualmente ⁽⁶⁹⁾.

Após o tratamento das pacientes, haveria grande benefício para o seguimento se houvesse como identificar algum marcador molecular, ou a combinação de alguns marcadores, que individualizasse o grupo de mulheres com maior probabilidade de persistência ou recorrência da doença, e para as quais devêssemos ter maior atenção no seguimento. Com isso haveria a concentração de recursos humanos e financeiros para aquelas pacientes que efetivamente mais precisam.

3.7 HPV e alterações glandulares

Apesar do aumento dos programas de rastreamento para o câncer de colo uterino nos países desenvolvidos e da diminuição da incidência do carcinoma cervical, a incidência do adenocarcinoma cervical continua a aumentar ⁽⁷⁷⁾. O aumento da detecção de lesões escamosas de alto grau acarreta a diminuição do surgimento da doença invasiva e consequente diminuição da mortalidade. O mesmo não acontece com as alterações glandulares. O maior número de diagnósticos de alterações glandulares “in situ” (AIS) não altera a incidência da doença glandular invasiva nem a mortalidade por ela causada ⁽⁷⁸⁾.

A incidência de AIS é bastante inferior à de HSIL. Nos Estados Unidos a incidência de HSIL é de 41,4 por 100.000 mulheres enquanto que a de AIS é de 1,25 por 100.000 mulheres. Mas esse número tem aumentado 5 a 6 vezes nas últimas décadas ^(78, 79).

A citologia oncótica cervical, apesar de ser extremamente importante na redução da doença cervical escamosa invasiva, não apresenta o mesmo desempenho em relação ao AIS e adenocarcinoma cervical ^(80, 81). Além disso, a história natural da doença glandular cervical não está bem explicada. Apesar do fato de a AIS ser muitas vezes considerada lesão precursora do adenocarcinoma cervical, não foi demonstrada a progressão da doença como nas alterações escamosas cervicais ⁽⁷⁸⁾.

A persistência da infecção pelo HPV está associada com a carcinogênese ectocervical e endocervical. A presença do HPV 16 e 18 foi demonstrada em mais de 80% dos casos de adenocarcinoma cervical ^(82, 83). Alguns fatores também estão associados ao adenocarcinoma cervical: baixo nível educacional, má higiene, uso de contraceptivo hormonal por longo período de tempo, alta paridade, infecção pelo herpes simples vírus (HSV). Tabagismo e infecção por clamídia não foram associados ao adenocarcinoma cervical ⁽⁸²⁾.

Alguns estudos demonstraram que a baixa expressão do p53 e do pRb na metade inferior do epitélio cervical está associada ao AIS ⁽⁸⁴⁾, enquanto que outros estudos mostram o aumento da expressão do p53 e do p16 no AIS e adenocarcinoma invasivo ⁽⁸⁵⁾.

Os dados da literatura ainda são controversos quanto às lesões cervicais glandulares, e a história natural da doença glandular cervical, lesões precursoras e a relação com o HPV ainda necessitam de mais estudos para sua elucidação.

4 Métodos

4.1 Pacientes

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 30 de janeiro de 2008 (Anexo A).

Todas as pacientes assinaram termo de consentimento informado redigido obedecendo às recomendações da Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo B). O convite para a participação do estudo e a aplicação do consentimento foi feito pelo médico pesquisador.

Foram incluídas no estudo 114 pacientes examinadas no Setor de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI) da Divisão da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período entre março de 2006 e maio de 2009. Foram incluídas as pacientes que apresentaram diagnóstico de alteração citológica ou histológica de alto risco e que foram submetidas ao tratamento de conização cervical por CAF nesse período (67).

Foram excluídas do estudo as pacientes que apresentaram sorologia positiva para o vírus do HIV, pacientes com transplante de órgãos e tecidos e portadoras de doenças reumatológicas.

As pacientes foram submetidas à conização do colo uterino para o tratamento de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) ou neoplasia intraepitelial cervical de alto

grau (NIC 2 ou 3). O diagnóstico da lesão foi realizado por exame de colpocitologia oncológica ou por biópsia dirigida por colposcopia do colo uterino.

4.1.1 Descrição da casuística

No período entre março de 2006 e maio de 2009 foram tratadas 114 mulheres no Setor de PTGI da Divisão da Clínica Ginecológica do HC-FMUSP por lesão intraepitelial de alto risco por meio da conização do colo uterino por CAF.

A idade dessas pacientes variou entre 20 anos e 57 anos com média de 33,89 (dp = 8,593). A idade mínima da primeira relação sexual relatada foi 9 anos e a máxima, 29, com média de 16,5 anos (dp = 2,836). O número de parceiros sexuais variou de 1 a 40, com média de 4,07 (dp = 5,221) parceiros sexuais por paciente. Outros dados descritivos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados descritivos da população estudada (Setor de PTGI da Divisão da Clínica Ginecológica do HC-FMUSP – Março de 2006 a Maio de 2009)

Idade	Variação: 20- 57 anos	Média 33,89 (dp= 8,593)
Idade da primeira relação sexual	Variação: 9- 29 anos	Média 16,5 (dp= 2,836)
Número de parceiros sexuais	Variação: 1- 40	Média 4,07 (dp= 5,221)
Número de partos	Variação: 0 - 7	Média 2,29 (dp= 1,538)
Tabagismo	Não fumantes	76 (66,7%)
	Fumantes	37 (32,5%)
	Nada	32 (28,1%)
Método anticoncepcional	Hormonal	42 (36,8%)
	Outros (DIU, laqueadura tubária, condom)	38 (33,3%)

4.2 Colposcopia

Antes de serem submetidas ao procedimento cirúrgico, todas as pacientes foram submetidas à colposcopia. O exame colposcópico foi realizado utilizando-se ácido acético a 2% e solução de Lugol a 5%.

As pacientes foram classificadas em dois grupos de acordo com os achados colposcópicos encontrados: achados maiores e achados menores.

Os achados maiores são alterações colposcópicas sugestivas de lesão intraepitelial de alto grau, representados por epitélio acetobranco denso, pontilhado grosseiro, mosaico grosseiro e vasos atípicos. Os achados menores representam alterações colposcópicas sugestivas de lesão intraepitelial de baixo grau: epitélio acetobranco tênue, pontilhado fino e mosaico fino ⁽⁸⁶⁾.

Essa classificação foi utilizada somente na colposcopia inicial, antes do procedimento cirúrgico.

4.3 Procedimento cirúrgico

As pacientes foram submetidas ao tratamento da lesão intraepitelial cervical utilizando a técnica de cirurgia de alta frequência (CAF). O aparelho utilizado foi o modelo Wavetronic 5000 da marca Loktal.

Os procedimentos foram realizados no ambulatório de PTGI (Patologia do Trato Genital Inferior) pelo mesmo médico assistente.

Com a paciente em posição ginecológica, o colo uterino foi identificado com uso de espéculo vaginal descartável. Um segundo espéculo vaginal foi colocado em posição transversa ao primeiro para a proteção das paredes vaginais. Foi realizada a anestesia local cervical com 2 ml de lidocaína a 1% às 2, 4, 7 e 11 horas do colo uterino. O sistema de eletrocautério foi utilizado na função “CUT” na potência seis (variação da potência entre 0 e 10). A alça de metal para a excisão utilizada era acessório do aparelho Wavetronic 5000 da marca Loktal e foi escolhida conforme o tamanho do colo uterino de cada paciente e do tamanho da lesão a ser excisada. Primeiro foi excisada a zona de transformação com margem de 2 mm da lesão e, a seguir, o canal cervical. Caso não houvesse lesão visível na zona de transformação cervical da paciente, apenas o canal cervical seria retirado. Após a excisão da peça cirúrgica, o eletrocautério foi alterado para a função “BLEND”, na potência seis, para a realização da hemostasia do leito cirúrgico ^(68, 69, 87).

A seguir foi colocado tampão vaginal e a paciente foi orientada a retirá-lo, em casa, após 12 horas. Após a retirada do tampão vaginal prescreveu-se o uso de Neomicina a 2% na forma de creme vaginal por sete noites.

Após o procedimento cirúrgico, as pacientes retornaram ao ambulatório de PTGI no intervalo de 7 dias a 10 dias para reavaliação pós-cirúrgica precoce e depois de 30 dias para avaliação do pós-operatório tardio. O seguimento posterior foi realizado aproximadamente a cada 6 meses durante o período de 24 meses.

Nos retornos iniciais de 7 dias a 10 dias e 30 dias foram avaliadas as condições clínicas e evolução pós-operatória cicatricial das pacientes.

Nos retornos subsequentes semestrais as pacientes foram submetidas à coleta de colpocitologia oncótica convencional, coleta de material para pesquisa de DNA viral e colposcopia com biópsia dirigida, se necessário.

Após o seguimento de 24 meses, se os resultados dos exames realizados estivessem normais, as pacientes receberiam alta do setor de PTGI. Se os resultados dos exames estivessem alterados, as pacientes permaneceriam em seguimento no ambulatório.

4.4 Captura híbrida para HPV de alto risco

O teste de captura híbrida é um teste amplificado de sinal que utiliza uma técnica de captura de anticorpo combinado com detecção do sinal por quimiluminescência. As amostras são preparadas adicionando-se uma solução-base que quebra os vírus ou bactérias, liberando o DNA a ser pesquisado. A seguir acrescenta-se o probe de RNA específico para o DNA desejado, criando um híbrido de DNA e RNA. Os híbridos de DNA e RNA são, então, capturados em uma fase sólida, recoberta por anticorpos específicos. Os híbridos de DNA e RNA capturados são detectados por anticorpos conjugados com fosfatos alcalinos e o sinal resultante é amplificado em mais de 3.000 vezes. A presença ou ausência do DNA pesquisado é verificada por uma reação de quimiluminescência ^(7, 88).

Foi usado o teste para a detecção do HPV por captura híbrida da Digene (© 1997 *Digene Corporation, Beltsville, MD, EUA*, atual Qiagen). A coleta foi feita pela introdução de 1 cm -1,5 cm da escova endocervical no orifício externo do colo

uterino e rotação horária da mesma. A escova, então, foi colocada no frasco do “kit” de captura fornecido pelo fabricante e o frasco agitado por 30 segundos. Foram realizadas apenas capturas com a chamada sonda B para HPV de alto risco, que incluem os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. A captura foi considerada positiva se o valor das unidades relativas de luz (RLU) fosse maior que 1.

O teste de captura híbrida para HPV foi colhido no período máximo de três meses antes do tratamento cirúrgico. Caso o intervalo de tempo fosse superior a três meses, um novo teste de captura híbrida para HPV seria colhido imediatamente antes da realização da conização.

4.5 Testes imuno-histoquímicos

As lâminas de todos os casos foram revisadas e a lâmina mais representativa da lesão de cada caso foi escolhida para a identificação do corte em parafina da peça cirúrgica. Esse corte, o mais representativo da lesão, foi usado para a realização dos testes imuno-histoquímicos.

Os testes imuno-histoquímicos utilizados para a pesquisa de E6 e p16 foram realizados de acordo com o seguinte protocolo:

4.5.1 Desparafinização e Reidratação

Foi feita a seleção das lâminas para serem testadas e os respectivos controles positivos para o anticorpo primário (para ambos foram utilizados carcinomas de células escamosas do colo uterino). Os controles negativos foram obtidos com a omissão dos anticorpos primários.

As lâminas foram colocadas no berço de coloração e desparafinizadas em três cubas de xilol por cinco minutos cada vez, em capela.

As lâminas foram reidratadas com mergulho em três cubas de etanol a 100% durante um minuto cada, em etanol a 95% durante um minuto, em etanol a 70% durante mais um minuto e durante cinco minutos em água destilada.

4.5.2 Reação imuno-histoquímica de p16

4.5.2.1 Recuperação antigênica

Para a reação do p16 os berços com as lâminas foram colocados em cubas contendo “Epitope retrieval solution” (Cintec “Histology kit”, MTM, Alemanha, solução 1:10) em panela de pressão programada para três minutos a 125 °C e 20 minutos a 90 °C. As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por dez minutos e lavadas em água destilada e em “Wash buffer” (Cintec “Histology kit”, MTM, Alemanha, solução 1:10) durante cinco minutos cada.

4.5.2.2 Bloqueio das peroxidases endógenas

A bandeja de incubação foi preparada de tal modo que funcionasse como uma câmara úmida, feito com papel toalha embebido em água destilada. A bandeja foi mantida úmida em todas as fases a partir dessa etapa para evitar a dessecação das lâminas.

Foi utilizado então o “Peroxidase blocking reagent” (Cintec “Histology kit”, MTM, Alemanha), 30 µL por lâmina durante cinco minutos e lavado em “Wash buffer” por duas vezes, durante cinco minutos cada lâmina e outra vez durante dois minutos.

4.5.2.3 Anticorpo primário

Foi acrescido o anticorpo p16 (“ready-to-use”) pelo tempo de 30 minutos em temperatura ambiente. E depois lavado com “Wash buffer” por duas vezes durante cinco minutos cada lâmina e outra vez durante dois minutos.

4.5.2.4 Amplificação da marcação

Foi adicionado o “Vizualization reagent” (Cintec “Histology kit”, MTM, Alemanha) pelo tempo de 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir lavado em “Wash buffer” por três vezes, durante cinco minutos cada.

4.5.2.5 Revelação com DAB

Adicionou-se 15 µL de “DAB chromogen” a 985 µL de “DAB substrate buffer (Polymer)”. Essa solução foi utilizada dentro do período de seis horas após a preparação. Foram aplicados 50 µL por lâmina e depois as lâminas foram incubadas por dez minutos, protegidas da luz.

Após a incubação as lâminas foram lavadas em “Wash buffer”.

4.5.3 Reação imuno-histoquímica do E6

4.5.3.1 Recuperação antigênica

Foi realizada em micro-ondas, em cuba com as lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, EUA), por três minutos a 125 °C. Após esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente, foram feitas lavagens em água corrente e água destilada.

4.5.3.2 Bloqueio das peroxidases endógenas

O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de dez minutos cada, seguidos de lavagens em água corrente e água destilada, além de lavagem com solução tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos.

4.5.3.3 Anticorpo primário

Para a reação do E6 o anticorpo primário utilizado foi o E6 (C1P5) sc460, monoclonal a partir de HPV 16 e HPV 18 E6 obtido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) na diluição de 1:200. A incubação das lâminas com anticorpo específico diluído em tampão PBS contendo soro albumina bovina (BSA) (SIGMA, EUA) 1,0% e NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% foi realizada por duas horas, em temperatura ambiente.

4.5.3.4 Amplificação e revelação

A revelação da reação foi realizada com o uso de “kit” Polímero – Peroxidase ADVANCE HRP (anticamundongo e anticoelho – DAKO Co Carpinteria, CA, EUA). A retirada de anticorpos primários excedentes e ligações não-específicas foram feitas pela lavagem com PBS 0,02% Twee-20. Posteriormente, as lâminas foram encubadas com ADVANCE LINK por 30 minutos, ADVANCE HRP por 40 minutos e então reveladas com DAB+ liquid (DAKO Co Carpinteria, CA, EUA) por cinco minutos.

4.5.4 Contracoloração

Foi utilizada a hematoxilina de Harris pelo período de um minuto e trinta segundos. E, a seguir, feita a lavagem em água corrente por quatro minutos.

A desidratação das lâminas foi feita passando por etanol a 70% durante um minuto, etanol a 95% durante um minuto e etanol a 100% por duas vezes de um minuto cada e, finalmente, por três cubas de xilol durante um minuto, cada passagem, e montar com Entellan® (Merck, Alemanha).

4.5.5 Classificação dos testes imuno-histoquímicos

Para a classificação do teste de imuno-histoquímica para o p16 foram usados os critérios que seguem:

1. O caso foi considerado “Positivo” se a lâmina apresentasse células com coloração nuclear e/ou citoplasmática contígua entre as camadas basal e parabasal do epitélio escamoso cervical, com presença ou não da coloração das células da camada superficial (Anexo C, Figura 1).
2. O caso foi classificado como “Negativo” se a coloração para o p16 aparecesse focalmente em células isoladas, não corando as células das camadas basal e parabasal; ou se não houvesse reação com o epitélio escamoso cervical.

Para a classificação do teste de imuno-histoquímica para o E6 foram usados os seguintes critérios:

1. O caso foi considerado “Positivo” se a lâmina apresentasse células do epitélio escamoso cervical com coloração nuclear (Anexo D, Figura 2).
2. O caso foi considerado “Negativo” se a lâmina não apresentasse coloração.

4.6 Análise estatística

O estudo realizado foi do tipo observacional longitudinal. Avaliou-se um grupo de 114 pacientes acompanhadas no setor de Patologia do Trato Genital Inferior (PTGI) da Divisão da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período entre março de 2006 e maio de 2009 que apresentou o diagnóstico de lesão intraepitelial de alto grau em citologia cervical ou na biópsia do colo uterino, submetido ao tratamento da lesão por cirurgia de alta frequência (CAF). Foram incluídas no estudo todas as pacientes tratadas que não apresentassem sorologia positiva para HIV, transplante de órgãos e tecidos e doenças reumatológicas.

Após o tratamento, as pacientes foram seguidas semestralmente pelo período de 24 meses com controles citológicos, coleta para teste de captura híbrida para HPV de alto risco e colposcopia.

A caracterização da amostra foi realizada por meio de estatística descritiva. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para a comparação de valores médios entre dois grupos. O teste exato de Fisher realizou a comparação entre variáveis categóricas. Para o cálculo dos parâmetros de acurácia da captura híbrida (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo), adotou-se a citologia cervical no acompanhamento como teste padrão. Em nosso serviço a citologia é o teste rotineiramente utilizado para o seguimento das pacientes tratadas por lesão de alto risco cervical.

Em todos os testes estatísticos o nível considerado foi de 5%.

Na análise estatística os resultados citológicos e histológicos foram agrupados em duas categorias:

1. Baixo grau: citologia normal. ASC-US e LSIL (citológicos); cervicite e NIC 1 (histológicos)
2. Alto grau: ASC-H, HSIL e AGC (citológicos); NIC 2, NIC 3, adenocarcinoma “in situ” e carcinoma microinvasivo e carcinoma invasivo (histológicos).

4.7 Fluxograma

5 Resultados

Os resultados citológicos das pacientes anteriores ao procedimento cirúrgico foram divididos em dois grupos com base na conduta apropriada a esses resultados. O mesmo foi feito para os resultados histológicos. A Tabela 2 apresenta a frequência desses resultados.

Tabela 2 - Achados citológicos e histológicos anteriores ao tratamento (Ambulatório de PTGI do HC-FMUSP – março de 2006 a maio de 2009)

		N	%
Citologia	Baixo grau	29	25,4
	Alto grau	85	74,6
Histologia	Baixo grau	15	13,2
	Alto grau	93	81,6
	Não realizado	6	5,3

Na colposcopia realizada antes do procedimento cirúrgico foram descritos achados classificados como maiores em 64 pacientes (56,1%) e menores em 34 (29,8%). Não foram descritos achados colposcópicos em 16 (14%) casos. Não houve associação significativa entre os achados colposcópicos e o anatomopatológico da peça operatória (Tabela 3).

Tabela 3 - Achados colposcópicos e exame anatomopatológico da peça cirúrgica

		Achados colposcópicos		TOTAL
		Menores	Maiores	
Exame anatomopatológico (N e %)	Baixo grau	13 (50%)	13 (50%)	26 (100%)
	Alto grau	21 (29,2%)	51 (70,8%)	72 (100%)
TOTAL		34 (34,7%)	64 (65,3%)	98 (100%)*

p = 0,091

* foram consideradas apenas as pacientes cujos dados referentes à colposcopia inicial estivessem completos.

Os achados histológicos da peça cirúrgica bem como as margens estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência dos achados histológicos da peça cirúrgica e avaliação das margens cirúrgicas

		N	%	TOTAL
Anatomopatológico	Baixo grau	29	25,4%	
	Alto grau	85	74,6%	
	Livres	77	67,5%	
	Comprometidas	35	30,7%	
	Não avaliadas	2	1,8%	
				114

A frequência dos resultados obtidos com o teste de captura híbrida para HPV prévia ao procedimento cirúrgico, testes imuno-histoquímicos para E6 e p16 realizados na peça cirúrgica estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes de captura híbrida para HPV prévia ao tratamento, imuno-histoquímica para E6 e p16 na peça cirúrgica

	Positivo	Negativo	Não realizado	TOTAL
CH (%)	108 (94,7%)	4 (3,5%)	2 (1,8%)	114 (100%)
E6 (%)	45 (39,5%)	69 (60,5%)	-	114 (100%)
p16 (%)	74 (64,9%)	40 (35,1%)	-	114 (100%)

Entre os dados que caracterizaram as mulheres estudadas, o hábito de fumar associou-se significativamente com menor frequência de expressão positiva de E6 no estudo imuno-histoquímico da peça cirúrgica (Tabela 6).

Tabela 6 - Tabagismo e teste imuno-histoquímico para E6 na peça cirúrgica

		E6		TOTAL
		Negativo	Positivo	
Tabagismo	Não fumante (%)	40 (52,6%)	36 (47,4%)	76 (100%)
	Fumante (%)	28 (75,7%)	9 (24,3%)	37 (100%)
TOTAL		68 (60,2%)	45 (39,8%)	113 (100%)*

p = 0,024

* foram consideradas apenas as pacientes cujas informações referentes ao hábito do tabagismo estivessem completas.

A comparação entre as expressões das proteínas p16 e E6 estão representadas na Tabela 7. Observar que a significância dessa correlação não aponta para as esperadas expressões conjuntas, mas ao contrário, há clara associação entre a não expressão concomitante dos marcadores.

Tabela 7 - Expressão das proteínas p16 e E6

		E6		TOTAL
		Negativo	Positivo	
p16	Negativo (%)	30 (75,0)	10 (25,0%)	40 (100%)
	Positivo (%)	39 (52,7%)	35 (47,3%)	74(100%)
TOTAL		69 (60,5%)	45 (39,8%)	114 (100%)

p = 0,027

O agrupamento dos achados citológicos e histológicos foi mantido inclusive na descrição dos resultados anatomopatológicos da peça cirúrgica do CAF: baixo grau, composto por cervicite crônica e NIC 1; e alto grau, composto por NIC 2, NIC 3, adenocarcinoma “in situ” e carcinoma microinvasor. A divisão foi realizada dessa forma, pois a probabilidade de recidiva é distinta para esses dois grupos (Tabela 8). A associação da expressão da proteína p16 com lesões graves mostra que essa forma de dicotomizar as lesões é pertinente.

Tabela 8 – Resultados da expressão da proteína p16 e exame anatomopatológico do CAF

		p16		TOTAL
		Negativo	Positivo	
Anatomopatológico	Baixo grau (%)	23 (79,3%)	6 (20,7%)	29 (100%)
	Alto grau(%)	17 (20,0%)	68 (80,0%)	85 (100%)
TOTAL		40 (35,1%)	74 (64,9%)	114 (100%)

p = 0,0001

Das 114 pacientes que realizaram o tratamento excisional para a lesão intraepitelial cervical de alto grau, 80 receberam alta do estudo após acompanhamento de 24 meses. Dessas, 58 realizaram o acompanhamento completo com quatro retornos semestrais com coleta de citologia, no período de 24 meses. As 22 pacientes que não realizaram os quatro retornos na sua totalidade tiveram ao menos uma citologia inicial e outra final colhidas após 24 meses do procedimento cirúrgico e, desse modo, foram incluídas nas análises, pois o intervalo entre o procedimento e a alta proposta foi respeitado. Os motivos de abandono do tratamento foram os mais diversos, como mudança de endereço residencial, mudança de endereço comercial, prisão e morte. Foram feitas quatro tentativas de contato com as pacientes faltantes ao longo do período de seguimento, por meio de ligações telefônicas e telegramas, realizadas pelo médico pesquisador e pelo serviço de assistência social do HC-FMUSP.

A população não aderente apresentou características semelhantes à população que completou o seguimento (Tabela 9).

Tabela 9 - Características da população com seguimento completo e seguimento parcial após o tratamento

	Achados	Completo	Parcial	p
Idade média (dp)		33,40 anos (8,592)	34,41 anos (8,642)	-
Idade da 1ª relação sexual (dp)		16,50 anos (2,948)	16,51 anos (2,738)	-
Parceiros sexuais (dp)		3,81 (4,279)	4,34 (6,097)	-
Número de partos (dp)		2,19 (1,606)	2,40 (1,471)	-
Tabagismo (N e %)	Não	44 (75,9)	32 (58,2)	0,07
	Sim	14 (24,1)	23 (41,8)	
Achados colposcópicos (N e %)	Menores	15 (28,8)	19 (41,3)	0,210
	Maiores	37 (71,2)	27 (58,7)	
Anatomopatológico do CAF (N e %)	Baixo risco	14 (24,1)	15 (26,8)	0,831
	Alto risco	44 (75,9)	41 (73,2)	
Margens (N e %)	Livres	40 (70,2)	37 (67,3)	0,839
	Comprometidas	17 (29,8)	18 (32,7)	

Entre as 80 pacientes que retornaram após 24 meses do procedimento cirúrgico, no momento da suposta alta do tratamento, seis apresentaram alterações citológicas de alto grau. A descrição das pacientes encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Descrição das pacientes com citologia alterada após 24 meses do procedimento cirúrgico

Paciente	Citologia e CH 24 meses	Nova citologia/ CH	Biópsia/ CAF	Seguimento Citologia/CH
1	HSIL / CH +	ASC-US / CH +	CAF : NIC 1	Normal / CH+
2	ASC-H / CH +		Bx : cervicite	Normal
3	AGC / CH +		CAF : NIC 3	Normal / CH -
4	ASC-H / CH +	ASC-US / CH +		HSIL / CH +
5	LSIL / CH +		Bx : NIC 1	Normal / CH-
6	LSIL / CH+		Bx : NIC 3	

Além dos casos acima descritos, durante o estudo cinco pacientes foram submetidas a nova conização cervical por CAF devido à recorrência da lesão cervical de alto grau, duas pacientes engravidaram e uma paciente foi submetida a tratamento de doença invasiva. Os dados estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11 - Descrição de intercorrências durante o estudo

Paciente	AP do CAF inicial	Intercorrência "Status" da CH	AP pós CAF	Seguimento
1	NIC3, MC	CAF no 3º controle Positiva	NIC3, ML	Sem seguimento
2	NIC2, ML	CAF no 3º controle Positiva	NIC2, ML	CCO: normal CH negativa
3	NIC3, MC	CAF no 2º controle Negativa	NIC1, ML	CCO: normal CH negativa
4	NIC3, ML	CAF no 3º controle Positiva	NIC3, MC	CCO: ASC-US CH positiva
5	NIC3, ML	Wertheim Meigs no 1º controle Positiva	Ca invasor	CCO: normal
6	NIC3, ML	Gestação no 2º controle Negativa		CCO: normal
7	CC	Gestação no 2º controle Negativa		Sem seguimento
8	NIC3, NA	CAF no 2º controle Positiva	NIC3	CCO: normal CH positiva

ML = margens livres

MC = margens comprometidas

NA = margens não avaliáveis

CCO = colpocitologia oncótica

Analisando o seguimento das pacientes tratadas, o comprometimento das margens cirúrgicas não se mostrou relacionado com a presença de alterações citológicas no seguimento após o tratamento da lesão intraepitelial de alto grau (Tabela 12).

Tabela 12 - Comprometimento das margens cirúrgicas e resultado da citologia em qualquer momento do seguimento

		Citologia		TOTAL
		Baixo grau	Alto grau	
Margens	Livres (N e %)	50 (90,9%)	5 (9,1%)	55 (100%)
	Comprometidas (N e %)	19 (82,6%)	4 (17,4%)	23 (100%)
TOTAL		69 (88,5%)	9 (11,5%)	78 (100%)*

p = 0,437

* foram consideradas as pacientes que receberam alta após os 24 meses de acompanhamento, desde que houvesse uma citologia aos 24 meses e cujas margens cirúrgicas tivessem sido avaliadas.

A expressão da oncoproteína E6 na peça cirúrgica não se relacionou com as alterações citológicas encontradas durante o seguimento das pacientes, como está demonstrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Relação entre a expressão da oncoproteína E6 na peça cirúrgica e alterações citológicas durante o seguimento pós-cirúrgico das pacientes

		E6		TOTAL
		Negativo (%)	Positivo (%)	
Citologia	Baixo grau (%)	40 (57,1%)	30 (42,9%)	70 (100%)
	Alto grau (%)	9 (90,0%)	1 (10,0%)	10 (100%)
TOTAL		49 (61,3%)	31 (38,8%)	80 (100%)*

p = 0,079

* foram consideradas as pacientes que receberam alta após os 24 meses de acompanhamento, desde que houvesse uma citologia aos 24 meses.

A expressão da proteína p16 na peça cirúrgica, apesar de estar associada à presença de lesões intraepiteliais cervicais mais graves, não se relacionou com as alterações citológicas apresentadas pelas pacientes durante o seguimento pós-cirúrgico (Tabela 14).

Tabela 14 - Relação da expressão da proteína p16 na peça cirúrgica e alterações citológicas durante o seguimento pós-tratamento cirúrgico

		p16		TOTAL
		Negativo (%)	Positivo (%)	
Citologia	Baixo grau (%)	24 (3,3%)	46 (65,7%)	70 (100%)
	Alto grau (%)	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10 (100%)
TOTAL		26 (32,5%)	54 (67,5%)	80 (100%)*

p = 0,486

* foram consideradas as pacientes que receberam alta após os 24 meses de acompanhamento, desde que houvesse uma citologia aos 24 meses.

Na análise do seguimento completo das pacientes, composto por quatro consultas de retorno em que foi coletada citologia, CH e realizada a colposcopia das pacientes, observamos que a CH positiva relacionou-se com alterações citológicas mais graves, presentes em qualquer momento do seguimento após o tratamento cirúrgico (Tabela 15).

Tabela 15 - ‘Resultado da CH e resultado da citologia em qualquer momento do seguimento completo após o tratamento cirúrgico

		Citologia		TOTAL
		Baixo grau	Alto grau	
Captura híbrida	Negativa (N e %)	39 (100%)	0 (0,0%)	39 (100%)
	Positiva (N e %)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	19 (100%)
TOTAL		53 (91,4%)	5 (8,6%)	58 (100%)*

p = 0,003

* foram consideradas apenas as pacientes que realizaram o seguimento completo com quatro consultas após o procedimento cirúrgico.

Considerando a CH coletada no primeiro retorno após o procedimento cirúrgico, a sensibilidade do teste de CH foi de 83,3% com especificidade de 87,8%. O VPP foi de 50% e o VPN do teste, 97,3%. Esses valores foram determinados considerando-se a citologia como padrão-ouro e estão de acordo com dados da literatura (76, 89).

A acurácia do teste de CH nos quatro momentos individualizados do seguimento, aos 6, 12, 18 e 24 meses, está disposta na Tabela 16.

Tabela 16 - Acurácia da CH nos quatro momentos do seguimento

	Valor Preditivo Positivo (VPP)	Valor Preditivo Negativo (VPN)	Sensibilidade	Especificidade	TOTAL
6 meses	50%	97,3%	83,3%	87,8%	94
12 meses	42,9%	96,4%	75%	87,1%	70
18 meses	33,3%	100%	100%	86%	61
24 meses	54,5%	98%	85,7%	90,7%	61

Ao usar a coleta de CH no primeiro retorno após o procedimento cirúrgico como um fator preditivo de alteração citológica a ser encontrada aos 24 meses, observa-se que a sensibilidade do teste de CH nesta situação é de 75% com especificidade de 83,1%, VPP de 20% e VPN de 98,3%, demonstrando alto valor da CH com o teste preditivo no seguimento das pacientes tratadas por lesão intraepitelial de alto grau (Tabela 17).

Tabela 17 - Comparação entre a CH do primeiro retorno com a citologia do quarto retorno

		Alteração citológica		TOTAL
		Baixo grau	Alto grau	
Captura híbrida (N e %)	Negativa	59 (98,3%)	1 (1,7%)	60 (100%)
	Positiva	12 (80,0%)	3 (20,0%)	15 (100%)
TOTAL		71 (94,7%)	4 (5,3%)	75 (100%)*

p = 0,024

* foram consideradas as pacientes que apresentaram tanto a citologia inicial aos 6 meses quanto a citologia final aos 24 meses após o procedimento.

6 Discussão

O tratamento das lesões cervicais intraepiteliais de alto risco é a janela de oportunidade para a redução da incidência do câncer cervical. Fazer o diagnóstico nessa fase da doença proporciona a possibilidade do tratamento eficaz e com morbidade muito menor se comparado ao tratamento da doença invasiva, sem contar com o alívio do estigma social e psicológico que a doença invasiva acarreta à paciente.

A exérese da lesão intraepitelial pode ser realizada por diversas modalidades de tratamento: conização clássica com bisturi, laser de CO₂ e cirúrgica de alta frequência (CAF) ^(68, 69, 90). Neste estudo, o tratamento usado foi a CAF, por ser um método ambulatorial, mais barato que a conização convencional e com menores índices de complicações descritos na literatura ^(70, 90).

Outro aspecto importante do tratamento da doença pré-maligna é o seguimento da paciente após a cirurgia. Mesmo tendo em vista a eficácia do tratamento usado ^(68, 91), o seguimento das mulheres tratadas deve ser realizado de maneira rigorosa e sistemática.

Tendo como meta o acompanhamento mais eficiente daquelas mulheres com maior probabilidade de recidiva da doença, diminuindo o ônus econômico de consultas dispensáveis e o ônus psicológico das pacientes com baixa taxa de recorrência, avaliou-se a presença do DNA viral após o tratamento cirúrgico bem como a expressão da oncoproteína viral E6 e da proteína p16 na peça cirúrgica como marcadores de recorrência da doença.

As 114 pacientes arroladas neste estudo foram diagnosticadas com lesão intraepitelial cervical de alto grau por meio do exame citológico ou histológico do colo uterino. Em nosso serviço, uma das indicações para a realização da conização cervical é a discordância entre o exame citológico e o exame histológico apresentados pela paciente ⁽⁹²⁾. Uma vez que a citologia cervical é um exame altamente específico ⁽⁵³⁾, mesmo que o exame histológico cervical não confirme o diagnóstico citológico ou que a biópsia cervical não seja realizada por ausência de alterações ao exame colposcópico, realizamos a conização cervical da paciente como forma de elucidação diagnóstica além de terapêutica ^(92, 93).

Na nossa casuística, 85 pacientes (74,6%) apresentaram diagnóstico citológico de lesão intraepitelial cervical de alto grau, 29 pacientes (25,4%) apresentaram diagnóstico citológico de lesão intraepitelial cervical de baixo grau. Nos exames histológicos, 93 mulheres (81,6%) apresentaram lesão intraepitelial cervical de alto grau, 15 (13,2%) apresentaram lesão intraepitelial cervical de baixo grau e 6 pacientes (5,3%) não realizaram biópsia cervical antes do procedimento por não apresentarem lesão cervical ao exame colposcópico. Os resultados citológicos e histológicos foram concordantes em 64 pacientes (59,2%), elas apresentaram lesão intraepitelial cervical de alto grau tanto no exame citológico quanto no exame histológico. Em 44 pacientes (40,7%) houve discordância entre o resultado do exame citológico e histológico. Em 15 casos (34%) o exame citológico diagnosticou lesão intraepitelial cervical de alto grau e o exame histológico, apenas lesão intraepitelial de baixo grau ou cervicite crônica. Já em 29 casos (66%) ocorreu o oposto: o exame citológico resultou em lesão intraepitelial de baixo grau, atipia de significado indeterminado possivelmente não neoplásica ou inflamação, enquanto que o exame

histológico evidenciou lesão intraepitelial cervical de alto grau. Na literatura, a discordância entre o exame citológico e o exame histológico está entre 11% e 28%⁽⁹⁴⁾. A alta taxa de discordância apresentada pelo nosso serviço, 40,7%, pode ser explicada pelo fato de se tratar de um hospital-escola, onde os médicos estão em treinamento e, com isso, tanto a coleta da citologia, quanto a escolha do local para a realização da biópsia cervical, bem como a avaliação do exame coletado podem não ter sido os mais adequados. Mais análises deveriam ser feitas nessa linha de raciocínio, uma vez que a concordância entre os vários exames diagnósticos deve ser a mais precisa possível.

Os achados colposcópicos observados nos exames realizados antes do procedimento cirúrgico evidenciaram 64 pacientes (56,1%) com achados ditos maiores, 34 pacientes (29,8%) com achados menores e, em 16 pacientes (14%), o exame colposcópico não foi descrito. Os achados maiores são alterações colposcópicas sugestivas de lesão intraepitelial de alto grau, representados por epitélio acetobranco denso, pontilhado grosseiro, mosaico grosseiro e vasos atípicos. Os achados menores representam alterações colposcópicas sugestivas de lesão intraepitelial de baixo grau: epitélio acetobranco tênue, pontilhado fino e mosaico fino (86). Em 70,8% dos casos (N= 51) o diagnóstico colposcópico de lesão intraepitelial cervical de alto grau foi confirmado na avaliação do espécime cirúrgico, entretanto essa associação não ocorreu de maneira estatisticamente significativa. Esse fato é semelhante ao encontrado na literatura^(95, 96).

Na avaliação das peças cirúrgicas o exame anatomopatológico revelou 29 casos (25,4%) de lesão intraepitelial cervical de baixo grau e 85 (74,6%) de lesão intraepitelial cervical de alto grau. As margens cirúrgicas apresentaram-se livres de lesão em 67,5% (N=77) dos casos, comprometidas em 30,7% (N= 35) dos casos e não avaliadas em 2 casos (1,8%). O “status” das margens cirúrgicas é consistente com estudos já publicados sobre tratamento e seguimento de lesão cervical de alto grau por CAF^(97, 98).

No seguimento das pacientes, o “status” das margens cirúrgicas não apresentou associação consistente com a persistência ou recorrência da doença. A associação existe, mas não foi estatisticamente significante, diferindo dos dados da literatura^(97, 99). Talvez com um número maior de pacientes essa associação pudesse ser verificada, o que, entretanto, não aconteceu nesta casuística.

Ainda em relação à análise histológica das peças cirúrgicas, 45 casos (39,5%) apresentaram positividade na reação imuno-histoquímica para oncoproteína E6, e em 69 casos (60,5%), a reação foi negativa.

A oncoproteína E6 dos HPV de alto risco está relacionada com a inativação do processo de apoptose celular pela degradação do p53⁽²⁹⁾, processo indispensável para a imortalização celular e consequente evolução da lesão pré-maligna para a doença invasiva. Supusemos que a expressão da oncoproteína E6 estivesse aumentada nas lesões intraepiteliais mais graves (NIC 2/3) quando comparadas às lesões intraepiteliais cervicais menos graves. Essa hipótese não se confirmou com os dados obtidos neste trabalho. A oncoproteína E6 não foi mais expressa nas lesões

intraepiteliais cervicais de alto grau diagnosticadas no anatomopatológico das peças cirúrgicas obtidas na conização cervical. A associação da expressão da E6 com as lesões cervicais de alto grau mostrou-se fraca e estatisticamente não significativa, corroborando alguns dados da literatura ⁽¹⁰⁰⁾ e discordando, em parte, de outros ⁽¹⁰¹⁾ e, principalmente, divergindo do esperado pela história natural da doença ⁽¹⁹⁾.

Outro dado observado sobre a expressão da oncoproteína E6 nas lesões intraepiteliais cervicais foi sua relação com o hábito de fumar referido pelas pacientes. O tabagismo mostrou-se associado com a menor expressão da oncoproteína viral E6 na peça cirúrgica retirada. Não há confirmação desse dado na literatura. A associação inversa ao tabagismo parece não guardar nenhum significado biológico relevante à luz dos conhecimentos atuais. Além disso, a oncoproteína E6, em nosso trabalho, não se mostrou associada a nenhum outro fator prognóstico de recidiva ou persistência da doença.

No entanto, a expressão da proteína p16 na peça cirúrgica esteve fortemente associada às lesões intraepiteliais de alto grau, corroborando dados da literatura publicados por outros autores ^(42, 44, 45). Em nosso estudo, 80% (N= 68) das pacientes com diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau na peça cirúrgica apresentaram expressão positiva para proteína p16. Nas pacientes cujo diagnóstico anatomopatológico do produto da conização foi lesão intraepitelial cervical de baixo grau, a expressão da proteína p16 foi negativa em 79,3% (N=23). A alta taxa de positividade da p16 em lesões graves do colo uterino, bem como a alta taxa de negatividade da p16 em lesões menos graves ilustram a biologia da progressão neoplásica decorrente da infecção persistente do HPV de alto risco e mostram a

vantagem de se usar esse marcador para dirimir eventuais dúvidas sobre as alterações citológicas de significado indeterminado ^(102, 103). Não houve, entretanto, associação da expressão da proteína p16 com taxa de recidiva da doença durante o seguimento das pacientes, o que limita o uso da expressão dessa proteína no seguimento de pacientes submetidas à cirurgia por lesão de alto grau.

Quando comparamos os achados histopatológicos da expressão da oncoproteína viral E6 com a proteína p16 nas peças cirúrgicas, esperávamos encontrar a associação entre a expressão positiva de ambos os marcadores na mesma peça. Essa associação até foi encontrada em 47,3% (N=35) dos casos, mas o que foi mais fortemente caracterizado nesta análise foi a expressão negativa simultânea dos dois marcadores em 75% dos casos (N=30). Acreditamos que este achado se justifique pela baixa taxa de positividade da expressão da oncoproteína E6, presente em 45 casos (39,5%). Em nosso estudo não nos foi possível avaliar a expressão da oncoproteína E7, pois a mesma não apresenta anticorpo comercializável até o momento. A expressão dessa proteína poderia incrementar a discussão a respeito das diferenças de expressão das proteínas E6 e p16, uma vez que a proteína E7 está diretamente relacionada à superexpressão da p16 ⁽¹⁴⁾.

Em nosso estudo, 108 pacientes (94,7%) apresentaram resultado positivo da captura híbrida para o DNA do HPV realizada previamente ao procedimento cirúrgico. Este resultado expressivo obtido em um grupo de pacientes com diagnóstico citológico ou histológico de lesão intraepitelial cervical de alto grau conhecido demonstra e reforça relevância da captura híbrida para HPV como possível teste de rastreio da doença ^(24, 60).

A identificação de HPV de alto risco é um marcador importante não apenas de infecção, mas também de doença e ratifica a utilização da CH no seguimento de pacientes submetidas a tratamento por lesões graves do colo uterino ^(60, 64).

Durante o acompanhamento de 24 meses de estudo, seis pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico complementar. Uma paciente foi diagnosticada com doença invasiva e foi submetida ao tratamento cirúrgico radical pela cirurgia de Wertheim- Meigs. Essa paciente apresentava resultado positivo da CH coletada após a conização cervical inicial. Outras cinco pacientes foram submetidas à nova conização cervical por CAF por recidiva da neoplasia cervical de alto grau. Dessas cinco pacientes, quatro apresentaram resultado positivo no teste de captura híbrida coletado no retorno após a conização cervical inicial. A única paciente submetida à nova conização cervical e que apresentava resultado negativo para HPV no teste de captura híbrida coletado no retorno após o primeiro procedimento cirúrgico teve, como resultado anatomopatológico do novo procedimento realizado, o diagnóstico de NIC 1.

Quando analisamos apenas as pacientes que receberam alta do estudo após 24 meses de seguimento, seis delas apresentaram alguma alteração citológica cervical. Todas apresentavam captura híbrida para HPV de alto risco positiva.

Para a análise de alguns dados, dividimos as pacientes que realizaram o seguimento completo de quatro retornos semestrais no período de 24 meses, das pacientes com seguimento incompleto, que seguiram por 24 meses mas não completaram as quatro consultas de retorno.

As características sociodemográficas dos dois grupos foram semelhantes.

Nas pacientes com seguimento completo não houve, em nenhum momento, casos de citologia com lesão intraepitelial cervical de alto grau nas pacientes com CH negativa. Dado esse respaldado pelos achados na literatura ^(64, 104).

Em nosso estudo comprovamos que a presença do DNA HPV após 6 meses do procedimento cirúrgico é uma forte evidência preditiva para recorrência da doença e que a ausência do DNA viral nesta fase indica uma baixíssima taxa de recidiva da doença durante os 24 meses de seguimento, concordando com vários estudos já publicados ^(24, 60, 62).

Ao avaliarmos a CH coletada no primeiro retorno após o procedimento cirúrgico comparada à citologia deste retorno, a sensibilidade do teste foi de 83,3% , especificidade de 87,8%, VPP de 50% e VPN de 97,3%.

Ao compararmos o resultado da CH coletada no primeiro retorno com a citologia coletada no quarto e último retorno após 24 meses de seguimento, observamos a sensibilidade de 75%, especificidade de 83,1%, VPP de 20% e VPN de 98,3%. Esses dados enfatizam o uso da CH realizada seis meses após o tratamento da lesão intraepitelial cervical de alto grau como um fator preditivo de cura da paciente ⁽¹⁰⁴⁾.

Atualmente, em nosso serviço, utilizamos o seguimento com citologia cervical seriada, semestral por 24 meses, nas pacientes tratadas por lesão intraepitelial de alto grau com cirurgia de alta frequência. A citologia, sendo um método menos sensível que o teste de captura híbrida para o HPV, acarretaria perda de pacientes com possível taxa de recorrência da doença após o tratamento cirúrgico. Acreditamos que o seguimento combinado de citologia e captura híbrida para o HPV

no primeiro retorno após a cirurgia são excelentes parâmetros para estabelecer a conduta de seguimento das pacientes tratadas. Com resultados negativos em ambos os testes, a probabilidade de recorrência da lesão intraepitelial cervical de alto grau é desprezível e dessa maneira a paciente pode ser encaminhada para a rotina de seguimento anual após o tratamento. Dados esses corroborados pela literatura atual (76, 105, 106).

7 Conclusões

- Em nosso trabalho pudemos verificar que o teste de captura híbrida para a identificação do papilomavírus humano (HPV) oncogênico no seguimento de pacientes submetidas à conização do colo uterino devido à lesão intraepitelial de alto grau, por cirurgia de alta frequência (CAF), apresenta alto valor preditivo negativo de doença. A negatização do teste de CH após seis meses da realização do procedimento cirúrgico indica uma taxa de recorrência extremamente reduzida e a possibilidade de encaminhar essas pacientes para a rotina normal de seguimento anual. Desta forma, um grande número de pacientes tratadas se beneficiaria com a alta precoce após o tratamento cirúrgico. Um grupo reduzido de mulheres seria identificado, e o seguimento semestral poderia ser direcionado para esse grupo específico, reduzindo o número de consultas e, conseqüentemente, diminuindo o custo financeiro e emocional para essas mulheres.
- Avaliamos a acurácia da CH para HPV comparada ao exame citológico no primeiro retorno após 6 meses do procedimento cirúrgico. O teste apresentou sensibilidade de 83,3%, especificidade de 87,8%, VPN de 50% e VPP de 97,3%. Ao compararmos a CH para HPV coletada no primeiro retorno após o procedimento cirúrgico com a citologia coletada após 24 meses do procedimento, obtivemos a sensibilidade de 75%, especificidade de 83,1%, VPP de 20% e VPN de 98,3%.

- Avaliamos a expressão da proteína p16 e oncoproteína E6 na peça cirúrgica da conização como marcadores de recorrência. A expressão da proteína p16 associou-se às formas mais graves de lesão intraepitelial cervical, mas não demonstrou ser um marcador de recorrência ou persistência da doença durante o seguimento. A expressão da oncoproteína E6 não se mostrou associada à presença de lesões intraepiteliais mais graves ou à recorrência ou persistência da doença, não podendo, desse modo, ser usada como um marcador de lesão intraepitelial.

8 Anexos

Anexo A: Aprovação pela Comissão de Ética **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0596/07**, intitulado: "**VALOR DA CAPTURA HÍBRIDA PARA O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) NO SEGUIMENTO DE PACIENTES SUBMETIDAS A CONIZAÇÃO DO COLO UTERINO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) DEVIDO À LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU.**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Eduardo Vieira da Motta**

Pesquisador (a) Executante: **Maria Teresa Roncaglia**

CAPPesq, 12 de Fevereiro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa**

Anexo B: Termo de consentimento informado

Anexo I

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: O VALOR DA CAPTURA HÍBRIDA PARA O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) NO SEGUIMENTO DE PACIENTES SUBMETIDAS A CONIZAÇÃO DO COLO UTERINO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) DEVIDO À LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU (LIEAG).

PESQUISADOR: MARIA TERESA RONCAGLIA

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA VOLUNTÁRIA..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº104374

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 MESES

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

A senhora está sendo convidada a participar de um estudo clínico intitulado "O VALOR DA CAPTURA HÍBRIDA PARA O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) NO SEGUIMENTO DE PACIENTES SUBMETIDAS A CONIZAÇÃO DO COLO UTERINO POR CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) DEVIDO À LESÃO INTRA-EPITELIAL DE ALTO GRAU (LIEAG)".

A senhora é portadora de uma lesão no colo uterino que foi detectada pelo exame de Papanicolaou e pela biópsia do colo do útero. Essa lesão é causada pelo vírus do papiloma humano ou HPV. A lesão que a senhora apresenta é chamada de lesão intra-epitelial de alto grau, isso significa que se não for tratada pode, em alguns anos, transformar-se em um câncer de colo uterino.

O tratamento dessa lesão é feito através de uma cirurgia realizada no ambulatório de ginecologia. O procedimento é feito com anestesia local e a senhora vai para casa logo após o procedimento. Na cirurgia, é feita a retirada da parte doente do colo uterino. A anestesia local pode causar um pouco de cólicas, mas a cirurgia é rápida e bem aceita pelas pacientes.

O tratamento da lesão intra-epitelial de alto grau através da cirurgia não está sendo estudado. Esse já é o tratamento mais utilizado atualmente. O estudo do qual a senhora fará parte avalia o seguimento depois da cirurgia.

Normalmente, no ambulatório, o seguimento das mulheres que têm essa lesão e que fazem o tratamento com a cirurgia, é feito com o exame de Papanicolaou e colposcopia a cada 6 meses durante 2 anos. O estudo fará o mesmo seguimento, com a diferença de acrescentar a coleta de captura híbrida para HPV nas consultas de retorno e na última consulta será feita uma histeroscopia.

A captura híbrida é um exame que é colhido com uma escova como é feito o exame de Papanicolaou. O objetivo da captura híbrida para HPV é verificar se o vírus do HPV ainda encontra-se no colo após o tratamento da doença.

Na histeroscopia coloca-se uma câmera de vídeo dentro do útero para estudar a cavidade endometrial e o canal cervical. O canal cervical é uma das partes do colo uterino que é retirada no tratamento da lesão intra-epitelial de alto grau. A histeroscopia é um exame que pode causar desconforto leve, pois o ar colocado dentro do útero para aumentar a cavidade uterina causa cólicas durante o exame. Mas é um exame de curta duração.

Ao participar desse estudo, a senhora provavelmente não terá nenhum benefício adicional se comparada ao seguimento padrão, mas certamente ajudará outras mulheres com lesão intra-epitelial de alto grau que no futuro farão este mesmo tratamento e poderão receber alta um tempo menor que 2 anos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

DRA. MARIA TERESA RONCAGLIA
RUA SÃO CARLOS DO PINHAL, 248 AP 52 BELA VISTA 01333-000
CEL: 11 83839031

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo C – Figura 1

Figura 1 - Caso “Positivo” para o teste de imuno-histoquímica de p16. Lâmina positiva para p16 (Neoplasia intraepitelial grau 3, aumento X10)

Anexo D – Figura 2

Figura 2 - Caso “Positivo” para o teste de imuno-histoquímica de E6. Lâmina positiva para E6 (Neoplasia intraepitelial grau 3, aumento X10)

Anexo E - Relação dos dados clínico-laboratoriais das pacientes relacionadas ao estudo

	Nome	Idade	Fumo	MAC	Coitarca	Parceiros	Paridade	Colpo	CCO	Bx	AP CAF	Margens	CH Pré	1o CCO	1o CH	2o CCO	2o CH	3o CCO	3o CH	4o CCO	4o CH	ALTA
1	VLS	32	N	ACO	14	2	3	<	HSIL	NIC3	CC	ML	0,11	nl	0,36	nl	0,14	nl	0,24	nl	0,41	ALTA
2	FSR	23	N	ACO	15	3	0	>	LSIL	NIC2	NIC1	ML	1,08	LSIL	1,12	nl	0,29	-	-	nl	-	ALTA
3	ANF	20	S	ACO	15	3	0	>	nl	NIC2	NIC2	ML	1,09	nl	0,14	nl	3,95	nl	0,18	nl	3,95	ALTA
4	RMS	31	S	ACO	15	2	3	<	LSIL	NIC2	Ca microinvasivo	ML	2,69	nl	0,22	nl	0,48	nl	0,14	nl	0,23	ALTA
5	SISS	42	N	LT	13	40	3	-	HSIL	NIC3	NIC3	ML	2,72	nl	0,5	-	-	-	-	LSIL	2,89	ALTA
6	IMA	47	S	Nada	16	4	2	<	HSIL	NIC2	NIC2	ML	3,42	nl	0,28	ASC-US	0,41	HSIL *(recaf)	5,9	nl	0,27	ALTA
7	JMCS	33	S	ACO	19	4	1	>	LSIL	NIC3	NIC3	MC	3,48	HSIL	0,79	CAF:NIC1	-	nl	0,31	nl	-	ALTA
8	CRBA	34	S	Nada	21	30	1	>	HSIL	-	CC	ML	4,14	nl	0,48	ASC-US	-	nl	-	nl	0,12	ALTA
9	MN	42	N	Nada	19	3	2	>	HSIL+ AGC	NIC3	NIC3	ML	8,92	nl	55	nl	-	nl	0,23	nl	0,18	ALTA
10	LPS	49	N	Nada	17	1	4	<	HSIL	NIC2	NIC3	MC	15,29	nl	0,31	nl	0,37	nl	0,26	nl	0,21	ALTA
11	CARS	27	N	ACO	16	1	3	>	ASC-US	NIC2	NIC3	MC	16,46	nl	0,37	nl	0,3	nl	0,24	nl	0,19	ALTA
12	GJS	33	N	Nada	17	-	-	-	HSIL	NIC2	NIC3	MC	17,17	nl	0,26	nl	0,67	-	-	nl	0,32	ALTA
13	MLP	27	S	DIU	19	2	1	<	ASC-H+AGC	NIC2	NIC3	ML	17,9	nl	0,35	nl	0,12	nl	-	nl	-	ALTA
14	NSM	30	N	LT	19	10	3	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	22,39	ASC-US	289,53	nl	2,14	nl	10,86	nl	0,25	ALTA
15	FSCP	23	N	ACO	17	1	0	>	ASC-US	NIC2	NIC2	ML	29,18	ASC-US	0,42	-	-	-	-	nl	0,32	ALTA
16	RVAB	43	N	LT	15	1	4	<	HSIL	CC	NIC2	MC	29,28	nl	0,11	nl	0,45	nl	0,24	nl	0,18	ALTA
17	IMS	40	N	LT	15	2	2	>	ASC-H	CC	NIC3	MC	31,05	ASC-US	0,25	LSIL	0,6	nl	-	HSIL	4,17	ALTA
18	ACAS	24	N	Condom	17	5	0	>	nl	NIC3	NIC3+adeno in situ	ML	32,78	nl	0,12	nl	0,15	nl	0,26	nl	0,24	ALTA
19	NBJ	43	S	LT	12	5	2	<	HSIL	NIC3	CC	ML	35,3	nl	0,2	nl	0,22	nl	0,25	nl	-	ALTA
20	MCSA	23	N	ACO	16	2	3	<	LSIL	NIC3	NIC3	ML	51,47	nl	0,14	nl	0,26	nl	0,25	nl	-	ALTA
21	LAR	26	N	Nada	15	1	1	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	56,7	nl	0,14	nl	0,26	-	-	nl	-	ALTA
22	JFL	38	S	Nada	14	5	4	>	nl	NIC3	NIC3	ML	58,19	nl	0,33	nl	0,21	-	-	nl	0,18	ALTA
23	DNS	30	S	Condom	15	3	2	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	62,51	nl	0,17	nl	6,16	nl	2,43	nl	0,51	ALTA
24	ACPM	30	N	Nada	16	-	-	>	nl	NIC3	NIC2	ML	67,24	nl	0,53	nl	0,28	nl	0,23	nl	-	ALTA
25	MCJ	57	N	LT	15	8	5	<	HSIL	CC	NIC3	ML	69,16	nl	0,25	nl	0,13	nl	2,19	nl	0,23	ALTA
26	MAPP	36	N	Nada	-	-	-	-	HSIL	NIC2	NIC2	ML	70,29	LSIL	62,31	HSIL	31,7	-	-	ASC-H	47,21	ALTA
27	SPS	40	N	LT	13	5	5	<	ASC-US+AGC	NIC3	NIC3	ML	78,07	nl	1598,8	ASC-H	78,1	ASC-US	1,52	LSIL	969	ALTA
28	JJSS	37	N	ACO	21	2	1	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	93,3	nl	0,17	nl	0,17	nl	0,13	nl	0,35	ALTA
29	MNFS	42	S	Condom	19	2	0	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	97,67	nl	0,14	nl	0,14	nl	0,13	nl	0,14	ALTA
30	ECS	33	N	ACO	16	3	2	<	HSIL	NIC3	NIC2	ML	111,88	-	-	-	-	-	-	nl	0,5	ALTA
31	ADAS	36	N	Nada	16	2	3	<	HSIL	NIC2	NIC3	ML	129,99	nl	0,31	nl	0,44	nl	0,15	nl	0,3	ALTA
32	AR	23	S	IM	17	3	1	<	HSIL	NIC3	NIC1	MC	132,77	nl	0,27	nl	0,26	nl	0,44	nl	0,16	ALTA
33	GOS	49	N	Condom	17	4	1	<	HSIL	CC	CC	ML	150,13	nl	0,17	nl	0,25	nl	369,4	nl	40,83	ALTA
34	LLS	50	N	Nada	-	-	-	-	HSIL	NIC3	NIC3	ML	159,19	ACG	121,9	HSIL	1245	CAF:NIC3	-	ASC-US	8,8	ALTA
35	EO	45	N	Nada	16	10	2	-	AGC	-	CC	ML	165,24	nl	0,56	-	-	-	-	nl	0,12	ALTA
36	CS	21	S	ACO	13	2	1	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	197,76	nl	0,16	nl	0,12	nl	0,38	nl	0,12	ALTA
37	RLNC	44	N	Condom	19	3	2	>	HSIL	NIC2	CC	ML	210,31	nl	0,72	nl	2,35	nl	0,1	nl	0,14	ALTA
38	MFm	34	N	LT	13	2	7	<	ASCUS	NIC3	NIC1	ML	230,55	nl	37,49	nl	58,3	HSIL	134,4	AGC	75,19	ALTA
39	EOC	29	N	Condom	14	4	3	>	HSIL	NIC2	NIC2	ML	230,69	nl	0,25	nl	1,06	nl	0,19	nl	0,12	ALTA
40	MLMS	39	N	-	-	-	-	-	HSIL	NIC3	NIC3	MC	233,65	nl	0,44	LSIL	0,36	nl	0,14	nl	0,15	ALTA
41	MAFC	48	S	Nada	14	1	2	<	HSIL	NIC1	NIC3	ML	253,19	Ca invasor	401,51	-	-	-	-	nl	-	ALTA
42	MCS	43	N	ACO	29	1	1	>	nl	NIC2	NIC2	ML	293,49	nl	0,13	nl	0,14	nl	0,12	nl	0,18	ALTA
43	SADS	27	S	ACO	15	3	3	>	HSIL	NIC3	NIC3	MC	308,32	nl	0,16	nl	0,14	nl	0,2	nl	0,31	ALTA
44	EDCS	40	N	LT	22	3	3	>	HSIL	NIC3	NIC3	NA	330,99	nl	0,16	nl	0,3	nl	0,45	nl	0,45	ALTA
45	PPS	24	N	Nada	16	-	-	-	HSIL	NIC2	NIC2	MC	353,94	nl	0,21	nl	0,26	nl	0,5	nl	0,33	ALTA

continua

Anexo E - Relação dos dados clínico-laboratoriais das pacientes relacionadas ao estudo (continuação)

	Nome	Idade	Fumo	MAC	Coitarca	Parceiros	Paridade	Colpo	CCO	Bx	AP CAF	Margens	CH Pré	1o CCO	1o CH	2o CCO	2o CH	3o CCO	3o CH	4o CCO	4o CH	ALTA
46	PBA	35	N	ACO	14	3	2	>	HSIL	CC	NIC3	ML	356,53	nl	0,3	nl	0,46	nl	0,26	nl	-	ALTA
47	NCFS	27	N	IM	16	1	0	>	LSIL	NIC2	NIC2	MC	363,18	LSIL	39,37	nl	0,26	nl	0,1	nl	0,21	ALTA
48	AAS	22	N	ACO	19	3	0	>	nl	NIC3	NIC3	ML	435,54	nl	0,2	nl	0,26	nl	0,24	nl	0,28	ALTA
49	MFS	35	N	LT	21	3	2	>	HSIL	NIC2	NIC2	ML	457,74	nl	0,18	nl	0,36	nl	0,18	nl	0,19	ALTA
50	MRS	22	N	IM	17	2	1	>	HSIL	NIC3	NIC1	ML	463,92	nl	0,32	-	-	nl	-	nl	-	ALTA
51	GNF	28	N	Condom	18	4	0	>	LSIL	NIC2	CC	ML	473,97	nl	0,47	nl	0,28	nl	0,41	nl	0,28	ALTA
52	MSFG	30	N	Vasect	14	4	4	>	HSIL	NIC3	NIC3	MC	485,05	nl	0,15	nl	0,13	nl	0,13	nl	0,23	ALTA
53	MRS	53	N	Nada	15	3	3	<	HSIL	-	NIC3	NA	503,8	ASC-H	68,58	CAF:NIC3	-	nl	24,41	ASC-H	16,96	ALTA
54	VVM	46	N	LT	17	2	3	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	506,81	nl	0,11	nl	0,27	nl	0,12	nl	0,1	ALTA
55	MAAA	27	N	Condom	14	8	0	>	HSIL	NIC2	NIC3	MC	518,4	nl	20,03	HSIL	40,2	ASC-US	250,1	nl	-	ALTA
56	INS	31	N	LT	16	1	5	>	HSIL	NIC2	NIC3	MC	525,42	nl	0,18	nl	0,12	nl	0,65	nl	0,33	ALTA
57	RPS	29	N	Nada	18	5	3	>	HSIL	NIC2	NIC3	MC	707,7	-	-	nl	0,19	-	-	nl	0,14	ALTA
58	FGP	31	N	Condom	15	4	5	>	HSIL	CC	NIC3	MC	737,19	nl	0,3	nl	-	nl	0,11	nl	-	ALTA
59	AMN	37	N	IT	21	3	1	<	HSIL	NIC2	CC	ML	761,05	nl	0,19	nl	-	-	-	nl	0,47	ALTA
60	CMSAS	37	N	LT	16	2	4	>	HSIL	NIC1	NIC1	ML	776,86	nl	0,28	nl	0,24	nl	0,49	nl	0,13	ALTA
61	NSS	24	N	ACO	16	1	1	>	HSIL	NIC3	NIC2	ML	909,75	nl	0,13	nl	0,17	nl	0,12	nl	0,12	ALTA
62	LRS	25	N	ACO	12	5	0	>	HSIL	NIC1	NIC1	ML	929,71	nl	1,92	nl	0,38	nl	-	nl	0,8	ALTA
63	AAIR	51	S	Nada	16	10	3	>	HSIL	NIC2	NIC2	ML	1001,4	LSIL	541,04	nl	4,28	nl	-	nl	252,8	ALTA
64	MFC	48	N	Nada	17	2	4	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	1121,8	nl	0,1	nl	0,14	LSIL	47,4	ASC-US	0,13	ALTA
65	RR	25	S	ACO	15	6	1	>	AGC	NIC3	NIC3	MC	1233,9	nl	0,14	nl	0,12	nl	0,1	nl	0,24	ALTA
66	VCM	25	N	ACO	18	1	1	<	LSIL	NIC2	NIC1	MC	1382,1	nl	0,12	nl	0,11	nl	0,14	nl	0,28	ALTA
67	AAS	27	N	Condom	16	4	2	>	LSIL	NIC2	NIC1	ML	1630,7	nl	0,16	nl	0,39	nl	0,19	nl	0,42	ALTA
68	AFG	38	N	Condom	14	3	2	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	1741,9	nl	0,63	-	-	-	-	nl	0,4	ALTA
69	PLC	23	S	ACO	9	10	3	>	LSIL	NIC2	NIC1	MC	1977,2	-	-	-	-	-	-	nl	-	ALTA
70	SLO	41	S	Condom	22	1	1	>	nl	NIC3	NIC2	ML	2071,7	nl	0,21	nl	0,19	nl	0,13	nl	0,17	ALTA
71	AMS	34	N	Condom	17	5	2	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	2262,9	nl	0,85	nl	0,96	nl	0,23	nl	1,55	ALTA
72	FM	31	S	IM	17	8	1	-	HSIL	NIC3	CC	ML	-	nl	11,91	nl	0,26	nl	0,23	nl	0,3	ALTA
73	VRS	38	S	-	-	-	-	-	HSIL	NIC3	CC	ML	-	nl	-	-	-	-	-	nl	-	ALTA
74	MDCLT	35	N	ACO	14	3	2	-	ASC-H	NIC3	NIC3	MC	13,8	nl	0,45	nl	0,61	nl	-	LSIL	0,16	ALTA
75	MCP	30	N	-	-	-	-	-	AGC	NIC3	NIC3	ML	37,52	nl	0,23	nl	0,94	nl	0,13	nl	-	ALTA
76	ZPS	32	N	Nada	17	-	-	-	HSIL	-	NIC3	MC	80,89	ASC-H	8,26	nl	0,4	nl	0,43	nl	0,19	ALTA
77	JTA	27	N	ACO	14	2	2	>	AGC	NIC3	CC	ML	90,07	nl	0,21	nl	0,26	nl	0,23	nl	-	ALTA
78	APMF	31	S	Nada	15	3	2	>	HSIL	NIC3	NIC3	MC	95,63	-	-	-	-	-	-	nl	-	ALTA
79	MSF	40	S	ACO	22	2	3	>	HSIL	CC	NIC3	MC	348,1	LSIL	0,32	-	-	nl	-	nl	-	ALTA
80	CSL	23	N	ACO	13	3	2	<	LSIL	NIC2	NIC3	ML	2009,9	nl	0,26	nl	0,95	nl	0,61	nl	-	ALTA
81	ESOE	45	N	LT	19	3	3	>	HSIL	CC	CC	ML	0,15	nl	0,13	nl	0,16	-	-	-	-	-
82	MGs	41	-	LT	18	3	4	<	HSIL	-	CC	ML	0,15	nl	0,18	-	-	nl	107	-	-	-
83	BMM	29	N	IT	16	3	4	<	ASC-US	NIC2	CC	ML	0,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	NMP	34	N	ACO	16	20	3	<	HSIL	NIC2	NIC2	MC	6,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	SRDV	27	S	ACO	16	1	2	<	ASC-US	NIC2	CC	ML	16,02	nl	0,26	-	-	-	-	-	-	-
86	SPS	21	S	ACO	14	4	0	<	ASC-H	NIC3	NIC1	ML	17,11	nl	-	-	-	-	-	-	-	-
87	MNX	44	S	LT	17	3	3	>	ASC-H	NIC3	NIC3	MC	17,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	EH	30	N	Nada	15	2	0	<	HSIL	NIC1	NIC3	ML	42,21	nl	0,21	nl	-	-	-	-	-	-
89	CVM	33	N	Nada	18	2	1	<	ASC-US	NIC3	CC	ML	44,93	nl	-	nl	0,13	nl	-	-	-	-
90	NFSL	47	S	Condom	24	1	4	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	47,21	nl	0,44	nl	1,5	nl	-	-	-	-

continua

Anexo E - Relação dos dados clínico-laboratoriais das pacientes relacionadas ao estudo (conclusão)

	Nome	Idade	Fumo	MAC	Coitarca	Parceiros	Paridade	Colpo	CCO	Bx	AP CAF	Margens	CH Pré	1o CCO	1o CH	2o CCO	2o CH	3o CCO	3o CH	4o CCO	4o CH	ALTA
91	SCR	30	N	Condom	14	2	2	>	HSIL	NIC2	CC	ML	55,48	nl	0,25	gestacao	-	-	-	-	-	-
92	RNSG	42	S	Nada	16	1	2	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	58,81	nl	0,18	-	-	-	-	-	-	-
93	MZAC	43	S	LT	18	2	2	>	nl	NIC3	NIC3	ML	59,84	nl	-	-	-	-	-	-	-	-
94	MFC	30	N	ACO	24	2	6	>	ASC-H	NIC3	NIC3	ML	70,79	nl	1,11	-	-	-	-	-	-	-
95	COB	46	N	Nada	23	4	5	<	LSIL	NIC2	NIC3	MC	71,54	LSIL	151,83	HSIL	65,9	CAF:NIC3	65,9	-	-	-
96	MGS	28	S	IM	14	3	6	<	HSIL	NIC2	NIC3	ML	82,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	AMF	35	N	LT	16	5	3	>	HSIL+ AGC	NIC2	NIC3	ML	101,13	ASC-US	0,18	nl	0,16	-	-	-	-	-
98	CJSN	40	N	Nada	-	-	-	-	HSIL	NIC2	NIC3	MC	101,89	nl	0,24	-	-	-	-	-	-	-
99	NLFS	38	N	LT	18	4	2	>	ASC-H	CC	CC	ML	111,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	SNF	24	S	Nada	15	2	4	<	HSIL	NIC1	NIC1	ML	168,71	nl	0,23	-	-	-	-	-	-	-
101	AMA	33	S	Condom	15	3	4	>	HSIL	NIC2	NIC2	MC	205,82	nl	0,11	nl	0,08	nl	0,11	-	-	-
102	MBE	23	N	ACO	15	1	1	<	HSIL	NIC3	NIC3	ML	257,16	nl	0,24	nl	-	-	-	-	-	-
103	ARS	28	S	IM	16	6	3	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	279,1	ASC-US	2,09	-	-	-	-	-	-	-
104	RJT	30	N	LT	15	2	3	-	HSIL	NIC1	NIC3	MC	311,71	HSIL	46,46	nl	-	nl	0,21	-	-	-
105	GSCS	25	S	ACO	18	12	0	>	HSIL	NIC3	NIC3	MC	320,6	nl	0,21	nl	-	-	-	-	-	-
106	CSAO	30	S	IM	16	3	4	<	HSIL	-	NIC3	MC	364,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	TJ	33	N	Nada	18	2	3	>	LSIL	NIC3	NIC3	ML	420,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	RR	38	N	Nada	15	3	3	>	HSIL	NIC3	NIC3	ML	483,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	MEJ	24	S	IM	16	4	1	>	HSIL	NIC2	NIC3	ML	542,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	VP	31	S	LT	14	1	3	<	LSIL	NIC3	NIC3	ML	805,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	FFF	27	N	Nada	18	2	2	<	LSIL	NIC2	NIC2	MC	901,53	nl	0,15	-	-	nl	0,29	-	-	-
112	MIFD	56	N	Nada	-	-	-	-	HSIL	NIC3	NIC3	MC	1262,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	ASFS	29	S	ACO	16	3	2	-	HSIL	NIC2	NIC2	MC	1314,3	nl	17,55	-	-	nl	0,69	-	-	-
114	KCAC	25	N	ACO	16	5	0	>	nl	NIC3	NIC3	MC	1853,5	-	-	ASC-H	2,09	-	-	-	-	-

Legenda

S	Sim	Colpo	Achados colposcópicos	CCO	colpocitologia oncológica	ML	Margens livres	Ca	Carcinoma
N	Não	>	Maiores	nl	Normal	MC	Margens comprometidas	adenoca	Adenocarcinoma
MAC	Método anticoncepcional	<	Menores	LSIL	Lesão intra-epitelial de baixo grau	NA	Não avaliáveis	CAF	Conização por cirurgia de alta frequência
ACO	Anticoncepcional oral			HSIL	Lesão intra-epitelial de alto grau	CH	Captura híbrida para HPV	-	Dado não disponível
IM	Injetável mensal			ASC-US	Atipia indeterminada não neoplásica	CC	Cervicite crônica		
IT	Injetável trimestral			ASC-H	Atipia indeterminada, não se pode excluir alto grau	NIC1	Neoplasia intra-epitelial grau 1		
LT	laqueadura tubária			AGC	Atipia celular glandular	NIC2	Neoplasia intra-epitelial grau 2		
Vasect	Vasectomia			Bx	Biópsia	NIC3	Neoplasia intra-epitelial grau 3		

9 Referências

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
3. Howlader N NA, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*. National Cancer Institute Bethesda, MD. 2010 November 2010.
4. Cordeiro BPV, Felipe CFP, Noronha CP, Ramos DN, Cabral ESC, Ferreira JMdo, et al. *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer. 2009.
5. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
6. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 May 25;401(1):70-9.
7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Feb 6;348(6):518-27.

8. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Aug 1;121(3):621-32.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. [Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Sep;189(1):12-9.
10. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*. [Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Jun 7;87(11):796-802.
11. Syrjanen K, Shabalova I, Naud P, Kozachenko V, Derchain S, Zakharchenko S, et al. Persistent high-risk human papillomavirus infections and other end-point markers of progressive cervical disease among women prospectively followed up in the New Independent States of the Former Soviet Union and the Latin American Screening study cohorts. *Int J Gynecol Cancer*. [Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jul;19(5):934-42.
12. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. [Review]. 2000 May 3;92(9):690-8.
13. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. [Review]. 1996 Oct 9;1288(2):F55-78.
14. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. [Review]. 2002 May;2(5):342-50.

15. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
16. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 1998 Jan;16(1):330-7.
17. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*. [Review]. 2002 Jun;24(3):275-90.
18. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*. [Review]. 1995 Nov 15;76(10 Suppl):1902-13.
19. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2008;153(3):397-408.
20. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. [Review]. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10.
21. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM. The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1988 May 20;53(4):539-47.
22. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989 Oct;63(10):4417-21.
23. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci*. [Review]. 2004 Jan;50(1-2):9-19.

24. Bhatla N, Moda N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res.* [Review]. 2009 Sep;130(3):261-5.
25. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2002 Apr;55(4):244-65.
26. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* [Review]. 2009 Feb 20;384(2):324-34.
27. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 Dec 21;63(6):1129-36.
28. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1990 Apr 6;248(4951):76-9.
29. Li X, Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol.* [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Jul;70(7):4509-16.
30. Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1995 Jan 19;10(2):261-8.
31. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1992 Dec;66(12):6893-902.

32. Mantovani F, Banks L. Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999 Jun 3;18(22):3309-15.
33. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Mar 7;380(6569):79-82.
34. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 1965 Mar;37:614-36.
35. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2004 Jun;68(2):362-72.
36. Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1986 Jul;83(13):4680-4.
37. Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M, et al. Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2001 Aug 15;15(16):2146-60.
38. Frolov MV, Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2004 May 1;117(Pt 11):2173-81.
39. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. [Review]. 2010 Feb;40(1):1-13.

40. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Jan 25;277(4):2923-30.
41. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Oct 15;56(20):4620-4.
42. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. [Review]. 2008 Oct;17(10):2536-45.
43. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1996 Apr 30;93(9):4350-4.
44. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998 Dec;153(6):1741-8.
45. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*. [Review]. 2007;23(4):315-30.
46. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang SC, Pater MM, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1997;75(10):1410-6.
47. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J*.

[Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Aug 15;22(16):4212-22.

48. Murphy N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG, Hughes C, et al. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May;58(5):525-34.

49. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Aug 29;97(18):10002-7.

50. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Mar 1;178(5):3186-97.

51. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 1999 Dec 13;18(53):7690-700.

52. Casado L, editor. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 1 ed. Rio de Janeiro 2011.

53. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Feb 18;96(4):280-93.

54. Apgar BS, Zoschnick L, Wright TC, Jr. The 2001 Bethesda System terminology. *Am Fam Physician*. [Review]. 2003 Nov 15;68(10):1992-8.
55. Maddox P, Szarewski A, Dyson J, Cuzick J. Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. *J Clin Pathol*. 1994 Jan;47(1):15-7.
56. Palo G. CW, Dexeus S. *Patologia e Tratamento do Trato Genital Inferior*. 1 ed: Editora Médica e Científica Ltda.; 2002.
57. Nelson JH, Jr., Averette HE, Richart RM. Dysplasia, carcinoma in situ, and early invasive cervical carcinoma. *CA Cancer J Clin*. 1984 Nov-Dec;34(6):306-27.
58. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. [Review]. 1993 Apr;12(2):186-92.
59. Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Malila N, Tarkkanen J, Laurila P, et al. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *Journal of the National Cancer Institute*. [Comparative Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Dec 2;101(23):1612-23.
60. Franco EL. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monogr*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2003(31):89-96.
61. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Sep 1;119(5):1095-101.
62. Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/78-89.

63. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jun 1;191(11):1808-16.
64. Roncaglia MT, Tacla M, Vieira da Motta E, Caiaffa H, Ab'saber A, Alves VA, et al. Evaluation of the combination of cytology and hybrid capture to safely predict the high-grade lesion status of patients treated with conization with large loop excision of the transformation zone. *Acta Cytol.* 2011;55(5):421-5.
65. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *Journal of the National Cancer Institute.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2000 Mar 15;92(6):464-74.
66. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine.* [Review]. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/42-51.
67. Wright TC, Jr., Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol.* [Consensus Development Conference, NIH Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2007 Oct;197(4):346-55.
68. Prendiville W, Cullimore J, Norman S. Large loop excision of the transformation zone (LLETZ). A new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *British journal of obstetrics and gynaecology.* 1989 Sep;96(9):1054-60.
69. Lindeque BG. Management of cervical premalignant lesions. Best practice & research. [Review]. 2005 Aug;19(4):545-61.

70. Petry KU. Management options for cervical intraepithelial neoplasia. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology. 2011 Oct;25(5):641-51.
71. Murdoch JB, Morgan PR, Lopes A, Monaghan JM. Histological incomplete excision of CIN after large loop excision of the transformation zone (LLETZ) merits careful follow up, not retreatment. British journal of obstetrics and gynaecology. 1992 Dec;99(12):990-3.
72. Das N, Sutton V, Bevan J, Brinkmann D, Woolas R. Cytological follow-up of women older than 50 years with high-grade cervical smear treated by large loop excision. J Low Genit Tract Dis. [Comparative Study]. 2009 Jul;13(3):165-8.
73. Zaitoun AM, McKee G, Coppen MJ, Thomas SM, Wilson PO. Completeness of excision and follow up cytology in patients treated with loop excision biopsy. J Clin Pathol. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2000 Mar;53(3):191-6.
74. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? Bjog. 2001 Oct;108(10):1025-30.
75. Cecchini S, Carozzi F, Confortini M, Zappa M, Ciatto S. Persistent human papilloma virus infection as an indicator of risk of recurrence of high-grade cervical intraepithelial neoplasia treated by the loop electrosurgical excision procedure. Tumori. 2004 Mar-Apr;90(2):225-8.
76. Paraskevaidis E, Arbyn M, Sotiriadis A, Diakomanolis E, Martin-Hirsch P, Koliopoulos G, et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature. Cancer Treat Rev. [Review]. 2004 Apr;30(2):205-11.
77. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the

United States--a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol.* [Comparative Study]. 2000 Aug;78(2):97-105.

78. Sherman ME, Wang SS, Carreon J, Devesa SS. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival. *Cancer.* 2005 Mar 15;103(6):1258-64.

79. Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey JV, Jr., Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer.* 2004 Mar 1;100(5):1035-44.

80. Gunnell AS, Ylitalo N, Sandin S, Sparen P, Adami HO, Ripatti S. A longitudinal Swedish study on screening for squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: evidence of effectiveness and overtreatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Dec;16(12):2641-8.

81. Moreira MA, Longatto Filho A, Castelo A, de Barros MR, Silva AP, Thomann P, et al. How accurate is cytological diagnosis of cervical glandular lesions? *Diagn Cytopathol.* [Evaluation Studies]. 2008 Apr;36(4):270-4.

82. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute.* [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Mar 1;98(5):303-15.

83. Moreira MA, Longato-Filho A, Taromaru E, Queiroz G, Jube LF, Pinto SA, et al. Investigation of human papillomavirus by hybrid capture II in cervical carcinomas including 113 adenocarcinomas and related lesions. *Int J Gynecol Cancer.* [Multicenter Study]. 2006 Mar-Apr;16(2):586-90.

84. Kruse AJ, Skaland I, Munk AC, Janssen E, Gudlaugsson E, Baak JP. Low p53 and retinoblastoma protein expression in cervical intraepithelial neoplasia grade 3 lesions is associated with coexistent adenocarcinoma in situ. *Hum Pathol*. 2008 Apr;39(4):573-8.
85. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Innes J, Prime W, Herrington CS. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and apoptosis-related proteins in endocervical lesions. *Eur J Cancer*. 2007 Sep;43(13):2011-8.
86. O'Connor DM. A tissue basis for colposcopic findings. *Obstet Gynecol Clin North Am*. [Review]. 2008 Dec;35(4):565-82; viii.
87. Martin-Hirsch PP, Paraskevaidis E, Bryant A, Dickinson HO, Keep SL. Surgery for cervical intraepithelial neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*. [Meta-Analysis Review]. 2010(6):CD001318.
88. An In Vitro Nucleic Acid Hybridization Assay with Signal Amplification using Microplate Chemiluminescence for the Qualitative Detection of Human Papillomavirus (HPV Types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 in Cervical Specimens. 2007.
89. Roncaglia MT, M. T, Motta EV, Caiaffa H, Ab'saber V, Alves VAF, et al. Evaluation of combining cytology and hybrid capture to safely predict free of high grade lesion status in patients treated by conization with large loop excision of the transformation zone. *Acta Cytol*. In press 2011.
90. Prendiville W. Large loop excision of the transformation zone. *Clin Obstet Gynecol*. [Review]. 1995 Sep;38(3):622-39.
91. Boonlikit S, Junghuttakarnsatit P, Asavapiriyonont S. Treatment failure following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia at Rajavithi Hospital. *J Med Assoc Thai*. 2008 Jan;91(1):31-6.

92. Matthews KS, Rocconi RP, Case AS, Estes JM, Straughn JM, Jr., Huh WK. Diagnostic loop electrosurgical excisional procedure for discrepancy: do preoperative factors predict presence of significant cervical intraepithelial neoplasia? *J Low Genit Tract Dis*. 2007 Apr;11(2):69-72.
93. Golbang P, Scurry J, de Jong S, McKenzie D, Planner R, Pyman J, et al. Investigation of 100 consecutive negative cone biopsies. *British journal of obstetrics and gynaecology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1997 Jan;104(1):100-4.
94. Moss EL, Moran A, Douce G, Parkes J, Todd RW, Redman CW. Cervical cytology/histology discrepancy: a 4-year review of patient outcome. *Cytopathology*. 2010 Dec;21(6):389-94.
95. Ronco G, Volante R, Giubilato P. Cervical cancer screening in Italy: quality of colposcopy and treatment. 2009 activity. *Epidemiol Prev*. 2011 Sep-Dec;35(5-6 Suppl 5):78-86.
96. Aue-Aungkul A, Punyawatanasin S, Natprathan A, Srisomboon J, Kietpeerakool C. "See and Treat" Approach is Appropriate in Women with High-grade Lesions on either Cervical Cytology or Colposcopy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(7):1723-6.
97. Lubrano A, Medina N, Benito V, Arencibia O, Falcon JM, Leon L, et al. Follow-up after LLETZ: a study of 682 cases of CIN 2-CIN 3 in a single institution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Dec 14.
98. Treacy A, Devaney D, Mulligan NJ, Boyd W, O'Keane JC. Can a more detailed evaluation of excision margins refine cytologic follow-up of women post-LLETZ for high-grade dysplasia? *Int J Gynecol Pathol*. 2010 Sep;29(5):479-82.
99. Manchanda R, Baldwin P, Crawford R, Vowler SL, Moseley R, Latimer J, et al. Effect of margin status on cervical intraepithelial neoplasia recurrence following LLETZ in women over 50 years. *Bjog*. 2008 Sep;115(10):1238-42.

100. Trope A, Jonassen CM, Sjoborg KD, Nygard M, Dahl FA, Alfsen GC, et al. Role of high-risk human papillomavirus (HPV) mRNA testing in the prediction of residual disease after conisation for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Nov;123(2):257-62.
101. Sellors JW, Schweizer JG, Lu PS, Liu B, Weigl BH, Cui JF, et al. Association of elevated E6 oncoprotein with grade of cervical neoplasia using PDZ interaction-mediated precipitation of E6. *J Low Genit Tract Dis*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Apr;15(2):169-76.
102. Alameda F, Pijuan L, Lloveras B, Bellosillo B, Larrazabal F, Mancebo G, et al. The value of p16 in ASCUS cases: a retrospective study using frozen cytologic material. *Diagn Cytopathol*. 2011 Feb;39(2):110-4.
103. Ma YY, Cheng XD, Zhou CY, Qiu LQ, Chen XD, Lu WG, et al. Value of P16 expression in the triage of liquid-based cervical cytology with atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions. *Chin Med J (Engl)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Aug;124(16):2443-7.
104. Zielinski GD, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Berkhof J, Snijders PJ, Risse EJ, et al. HPV testing can reduce the number of follow-up visits in women treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Gynecol Oncol*. 2003 Oct;91(1):67-73.
105. Smart OC, Sykes P, Macnab H, Jennings L. Testing for high risk human papilloma virus in the initial follow-up of women treated for high-grade squamous intraepithelial lesions. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr;50(2):164-7.
106. Ostojic DV, Vrdoljak-Mozetic D, Stemberger-Papic S, Finderle A, Eminovic S. Cervical cytology and HPV test in follow-up after conisation or LLETZ. *Coll Antropol*. 2010 Mar;34(1):219-24.

10 Apêndices

APÊNDICES

- **Trabalho publicado:** Evaluation of the combination of cytology and hybrid capture to safely predict the high-grade lesion status of patients treated with conization with large loop excision of the transformation zone. Roncaglia MT, Tacla M, Motta EV, Caiaffa H, Ab'Saber A, Alves VAF, Longatto-Filho A, Baracat EC. Acta Cytologica.

ACTA
CYTOLOGICA

Gynecologic Cytopathology

Acta Cytologica 2011;55:421–425
DOI: [10.1159/000330808](https://doi.org/10.1159/000330808)

Received: May 4, 2011
Accepted: July 4, 2011
Published online: October 8, 2011

Evaluation of the Combination of Cytology and Hybrid Capture to Safely Predict the High-Grade Lesion Status of Patients Treated with Conization with Large Loop Excision of the Transformation Zone

Maria Teresa Roncaglia^a Maricy Tacla^a Eduardo Vieira da Motta^a
Hélio Caiaffa^c Alexandre Ab'Saber^d Venâncio Avancini Ferreira Alves^d
Adhemar Longatto Filho^{b, e} Edmund C. Baracat^a

^aDepartment of Gynecology, ^bLaboratory of Medical Investigation (LIM 14), Department of Pathology, and
^cLaboratory of Medical Investigation (LIM 03) and ^dDepartment of Pathology, Clinics Hospital, Faculty of Medicine,
São Paulo University, São Paulo, Brazil; ^eLife and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health
Sciences, University of Minho, Braga, Portugal

Key Words

Human papillomavirus · Hybrid capture · Conization ·
High-grade lesion

Abstract

Objectives: This study aimed to verify whether human papillomavirus (HPV) testing after conization treatment has some potential usefulness for predicting patients' outcome.

Study Design: One hundred and twenty women were treated for HSIL by conization with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). Cytology, colposcopy-guided biopsy, and hybrid capture 2 (HC2) HPV DNA tests were performed before the surgical procedure and every 6 months for 2 years at follow-up. **Results:** More than 90% of the patients tested positive for high-risk HPV prior to the surgical intervention. Six months after the cervical conization, 74.75% of the patients tested negative for high-risk HPV DNA, and 19.41% were positive. Of the women who were HC2 negative, 72 showed normal cytological smears, 3 ASC-US, 2 LSIL, and 1 HSIL. Of those who were HC2 positive, 8 showed normal smears, 2 ASC-US, 2 ASC-H, 5 LSIL, and 1 case had HSIL, AGC,

and squamous cells invasive carcinoma. Clinically, the HSIL case with a negative HPV test did not show any sign of high-grade lesions, and the clinical follow-up did not show residual lesions. **Conclusions:** Negative HPV tests correlated with freedom from high-grade disease after 2 years of postconization follow-up, which strongly suggests that negative HPV tests predict the absence of cervical disease.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cervical cancer is the third most common cause of cancer in Brazilian women [1]. In developed countries the 5-year survival rate varies from 51 to 70%. In underdeveloped countries the survival rate is lower, i.e. around 41% in a 5-year period [2].

The development of cervical cancer and its precursor lesions are necessarily related with persistent human papillomavirus (HPV) infection [3]. The infections associated with cervical carcinogenesis are caused by high-risk HPV types [4] and, importantly, carcinogenic pro-

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
0001-5647/11/0555-0421\$38.00/0
Accessible online at:
www.karger.com/acy

Correspondence to: Prof. Adhemar Longatto-Filho
Life and Health Sciences Research Institute
School of Health Sciences, University of Minho
PT-4710-057 Braga (Portugal)
Tel. +351 25 360 4827, E-Mail longatto@icsade.uminho.pt

gression does not happen in the absence of high-risk HPV [5].

The clinical expression of HPV progression in the uterine cervix is a high-grade lesion or cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 (CIN2 or 3).

Treatment of these lesions consists of excision, which is usually performed by conization with large loop excision [6, 7]. Some risk factors for the recurrence or persistence of high-grade disease are age, smoking, margin status of the cone, and HPV persistence [7–9].

The American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) recommends surveillance protocols after treatment for CIN2/3 involving repeat cytology at 4–6 months for up to 2 years and yearly thereafter. Prolonged follow-up is recommended since late reoccurrences have been reported.

The rationale of the presumed usefulness of HPV tests for diagnosis and to predict recurrence or persistence is supported by biological evidence that cervical cancer is necessarily involved with HPV infection. The high clinical sensitivity and high negative predictive values of hybrid capture 2 (HC2) tests and the cost-benefits of molecular assay performance support its use in posttreatment follow-up [10].

In our service we included HPV DNA testing in the follow-up after CIN2/3 treatment. The objective of this study was to verify whether absence or presence of the DNA virus after conization treatment is potentially useful and a predictive value in patients' outcome.

Patients and Methods

Between March 2006 and May 2009, 120 women were treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) by conization with large loop excision of the transformation zone (LLETZ) at the Department of Gynecology, Faculty of Medicine, São Paulo University.

The diagnosis was made using cervical cytology and by colposcopy-guided biopsy.

In 115 patients the HPV DNA test (® 1997; Digene Corporation, Beltsville, Md., USA) was performed before the surgical procedure. In 110 patients the HPV DNA test was positive and in 5 it was negative prior to the procedure.

After the surgery, the patients returned in 30–45 days for postoperative evaluation. Follow-up was every 6 months for 2 years. At each clinical visit a Pap smear, colposcopy, and HPV DNA test were performed.

Colposcopy was performed using 3% acetic acid and Lugol's iodine solution. A biopsy was sampled in the specific area if necessary.

All patients were informed about the procedure and signed an informed consent form approved by the ethical committee of the Clinics Hospital, Faculty of Medicine, São Paulo University.

Table 1. Distribution of cytological diagnoses according to HPV test status prior to the surgical procedure

Cytological diagnosis	DNA HPV positive, n (%)	DNA HPV negative, n (%)	Not tested n (%)
ASC-US	5 (4.16)	1 (0.83)	1 (0.83)
ASC-H	7 (5.8)	0	0
LISL	14 (11.66)	1 (0.83)	2 (1.66)
HSIL	69 (57.5)	3 (2.5)	2 (1.66)
AGC	5 (4.16)	0	0
Normal smear	10 (8.33)	0	0
Total	110 (91.67)	5 (4.16)	5 (4.16)

Hybrid Capture Assay

The HC2 protocol was performed according to the instructions of the manufacturer (Digene). Only high-risk HPV was tested (carcinogenic types include: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68).

Results

Conization with the LLETZ procedure was performed in 120 patients. Their ages ranged from 20 to 57 years (mean 33.97). The number of sexual partners referred varied between 1 and 40, the parity from 0 to 7 (mean 2.26). Smoking was a habit reported by 31.66% of the women. The contraceptive method most used was the combined oral birth control pill (29.16%; n = 35) followed by tubal ligation (18.33; n = 22). The other contraceptive methods cited were condoms (14.16%; n = 17), intrauterine devices (0.83%; n = 1), and monthly injectable contraceptives (8.33%, n = 10). No contraceptive method was used by 32 women (26.66%), and 2 of them did not report the contraceptive method used. The distribution of cytological diagnoses according to HPV test status prior to the surgical procedure is depicted in table 1. The preprocedure HPV DNA status of the patients, as compared with histopathological results, is shown in table 2.

Pathologic examination of the excised cervical specimen showed 21 instances of chronic cervicitis, 13 of CIN1, 19 of CIN2, 65 of CIN3, 1 of CIN3 and in situ adenocarcinoma, and 1 of microinvasive carcinoma. The margins of the excised specimen were free of disease in 83 patients, positive margins were reported in 35 patients, and in 2 cases the margins were evaluated.

A total of 103 patients returned for their 6-month follow-up consult and 72 were discharged after a 2-year follow-up period.

Table 2. Correlation between pre-LLETZ conization procedure HPV DNA status versus histopathological findings

Hybrid capture HPV test	Histopathological diagnoses, n (%)		
	CC/CIN1	CIN2/CIN3	Total
Negative	5 (100.0)	0	5 (100.0)
Positive	25 (22.7)	85 (77.3)	110 (100.0)
Total	30 (26.1)	85 (73.9)	115 (100.0)

p < 0.005.

At the follow-up consult the patients were examined by cervical Pap smear, an HPV DNA test, and colposcopy. The HPV DNA test was negative in 77 patients. The distribution of cytological diagnoses according to HPV test status after LLETZ is depicted in table 3.

Table 4 shows the results of the hybrid capture test pre-conization and postconization and according to margin status.

Based on the first follow-up consult after the large loop conization procedure, the negative predictive value of the HC2 test is 96.1%. The sensitivity of the test is 77% and the specificity is 88%.

After a 2-year period, 79 patients were discharged from the study. Seventy-four of them had an HPV DNA test prior to LLETZ and 72 had it done at the first follow-up visit. With the exception of 8 patients (3 had HPV DNA tests prior to the surgical procedure and missed the 6-month control, 1 did not have the HPV DNA test before the conization but had it during the first follow-up, and 4 did not have the HPV DNA test before or after the surgical procedure), all 71 patients had their HPV tests before and after the surgical procedure. Table 5 shows the percentage of hybrid capture test and Pap smear results according to the postconization intervention follow-up evaluated by four different conditions. In these four different conditions we compared the normality or abnormality of the Pap smear with the positivity or negativity of the HC2 test. Both showed strong concordance in the normal (normal Pap smear and negative HC2 test) and altered cases (altered Pap smear and positive HC2 test).

The margin statuses on the specimens were free of disease in 58 of the discharged cases; in 19 of them the margins were compromised, and in 2 cases it was not possible to examine the margin.

Table 3. Distribution of cytological diagnoses according to HPV test status after LLETZ conization

Cytological results	HC2 test, n (%)		
	positive	negative	not tested
Normal smear	8 (7.76)	71 (68.93)	6 (5.82)
ASC-US	2 (1.94)	3 (2.91)	
ASC-H	2 (1.94)	0	
LSIL	5 (4.85)	2 (1.94)	
HSIL	1 (0.97)	1 (0.97)	
ACG	1 (0.97)	0	
Invasive carcinoma	1 (0.97)	0	
Total	20 (19.41)	77 (74.75)	6 (5.82)

Table 4. Hybrid capture test results according to preconization and postconization intervention and according to margin status

Intervention	Hybrid capture test result, n (%)		
	positive	negative	not tested
Pre-LLETZ conization	95	4	4
Post-LLETZ conization	20	77	6
Free margin	73 (60.83)	5 (4.16)	5 (4.16)
Compromised margin	35 (29.16)	0	0
Not examined	2 (1.66)	0	0

Table 5. Percentage of hybrid capture test and Pap smear results, according to the postconization intervention follow-up, evaluated by four different conditions

		HC2 test		Total patients, n
		negative	positive	
<i>Pap smear result</i>				
6 months				
Normal	76.3 (n = 74)	10.3 (n =10)	97	
Abnormal	3.1 (n = 3)	10.3 (n = 10)		
12 months				
Normal	77.8 (n = 56)	11.1 (n = 8)	72	
Abnormal	2.8 (n = 2)	8.3 (n = 6)		
18 months				
Normal	80 (n = 51)	14 (n = 9)	64	
Abnormal	0	6.3 (n = 4)		
24 months				
Normal	78 (n = 46)	12 (n = 7)	59	
Abnormal	0	10 (n = 6)		

Discussion

The study herein presented endorses, in part, results recently reported [10]. The residual and recurrent disease rate after the conization procedure using LLETZ varies from 5 to 30% [11–13]. We hypothesized whether HC2 test would be able to safely predict the clinical outcome for patients treated for high-grade lesions and to identify the group of women more likely to have recurrent or persist disease.

As the women enrolled in our study were referred for colposcopic examination because of cytological and/or histological high-grade lesion diagnoses, it was not surprising that the vast majority of these women (>90%) tested positive for high-risk HPV. It was, however, important to observe that 6 months after the cervical conization 74.75% of them tested negative for high-risk HPV DNA and no clinical sign of disease was observed. Concomitantly, 19.41% kept their positive status.

Additionally, we also observed that of the women with a negative HPV DNA status, 72 had normal cytological smears, 3 had ASC-US, 2 had LSIL, and 1 had HSIL, which demonstrated a strong positive parallel with the clinical evaluation. Of the women that remained HPV DNA positive, 8 showed normal smears, 2 ASC-US, 2 ASC-H, 5 LSIL, and there was 1 case for each category (HSIL, AGC, and squamous cells invasive carcinoma). These results are very interesting because it was recently demonstrated that the most influential end point markers of disease progression to CIN2+ were HSIL based on Pap test results at 6 months and a positive HPV test because more than 6 months of persistent high-risk HPV is a very powerful predictor of cervical intraepithelial lesion progression [14].

Additionally, a systematic review of the potential usefulness of HPV testing mostly focused on the role of HC2 in follow-up after treatment for CIN for the detection of residual or recurrent CIN grade 2 or worse conducted by Chan et al. [15] demonstrated that the pooled sensitivity for HC2 was 90.7% (95% CI 75.4–96.9) and the pooled specificity was 74.6% (95% CI 60.4–85.0), which is similar to the values observed in this study (sensitivity 77% and specificity of 88%). The comparison has very strong significance because the pooled values were sourced from 20 reports published between 1992 and September 2007 which support the use of HC2 in the daily routine of posttreatment follow-up after high-grade lesion treatment.

Clinically, the HSIL found in negative HPV tests did not show any sign of high-grade lesions, and there were no residual lesions at clinical follow-up. Subsequent cytological tests did not ratify these findings. However, around 20% of the cases tested positive for high-risk HPV after conization, and 3 of them were categorized as HSIL in subsequent Pap tests. Conversely, a negative HPV test was not correlated with high-grade disease after 2 years of follow-up, which strongly suggests that a negative HPV test after 6 months of surgical treatment for CIN2+ predicts the absence of cervical disease on follow-up in these patients.

Acknowledgement

The authors are indebted to Clayton Zanardo de Oliveira from Barretos Cancer Hospital for his help with the statistical analysis.

References

- Cordeiro BPV, Felipe CFP, Noronha CP, Ramos DN, Cabral ESC, Ferreira JMdo, Oliveira JFP, Santos Mdo, Costa MdCED, Rebelo MS, Reis RdS: Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2009.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74–108.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.
- Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Sunsum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ: Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325:572.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, van der Linden HC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Meijer CJ: Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354:20–25.
- Prendiville W, Cullimore J, Norman S: Large loop excision of the transformation zone (LLETZ): a new method of management for women with cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:1054–1060.
- Flannelly G, Langhan H, Jandial L, Mana E, Campbell M, Kitchener H: A study of treatment failures following large loop excision of the transformation zone for the treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:718–722.

Apêndices

- 8 Sarian LO, Derchain SF, Pitta Dda R, Morais SS, Rabelo-Santos SH: Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol* 2004;31:270–274.
- 9 Verguts J, Bronselaer B, Donders G, Arbyn M, Van Eldere J, Drijkoningen M, Poppe W: Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. *BJOG* 2006;113:1303–1307.
- 10 Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, de Schipper FA, Snijders PJ, Voorhorst FJ, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Meijer CJ: HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59:543–553.
- 11 Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T: Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252–258.
- 12 Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Cook E, Whittaker L, Rhodes-Morris H, Silva E: A randomized clinical trial of cryotherapy, laser vaporization, and loop electrosurgical excision for treatment of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol* 1998;92:737–744.
- 13 Nuovo J, Melnikow J, Willan AR, Chan BK: Treatment outcomes for squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;68:25–33.
- 14 Syrjänen K, Shabalova I, Naud P, Kozachenko V, Derchain S, Zakharchenko S, Roteli-Martins C, Nerovjina R, Longatto-Filho A, Kljukina L, Tatti S, Branovskaja M, Hammes LS, Branca M, Grunjberga V, Erzen M, Sarian LO, Juschenko A, Costa S, Podistov J, Syrjänen S: Persistent high-risk human papillomavirus infections and other end-point markers of progressive cervical disease among women prospectively followed up in the New Independent States of the Former Soviet Union and the Latin American Screening Study Cohorts. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:934–942.
- 15 Chan BK, Melnikow J, Slee CA, Arellanes R, Sawaya GF: Posttreatment human papillomavirus testing for recurrent cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:422.e1–e9.

Apêndices

- **Trabalho submetido:** Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision. Roncaglia MT, Fregnani JHTG, Tacla M, Campos SGP, Caiaffa HH, Ab'Saber A, Motta EV, Alves VAF, Baracat EC, Longatto-Filho A. Archives of Gynecology and Obstetrics.

Archives of Gynecology and Obstetrics

Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision
Article Type:	Original Article
Section/Category:	Gynecologic Oncology
Keywords:	p16, E6 protein, hybrid capture, cytology, conization
Corresponding Author:	Adhemar Longatto-Filho, PhD University of São Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of São Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Maria Teresa Roncaglia, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Maria Teresa Roncaglia, MD José Humberto T.G. Fregnani, MD, PhD Maricy Tacla, MD, PhD Silvana Gisele Pegorin de Campos, PhD Hélio Hehl Caiaffa, BsC Alexandre AB'SABER, MD, PhD Eduardo Vieira da Motta, MD, PhD Venâncio Avancini Ferreira Alves, MD, PhD Edmund C Baracat, MD, PhD Adhemar Longatto-Filho, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Introduction: p16 and E6 are HPV-related proteins associated with uterine cervix high grade lesions</p> <p>Materials and methods: 114 women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) by conization with large loop excision of the transformation zone (LLETZ); after the surgery, the patients returned in 30 to 45 days for post operative evaluation. The follow-up was made every 6 months during 2 years. In each clinical visit Pap smear, colposcopy and HPV DNA test were performed. In the surgical specimen E6 and p16 immunohistochemical tests were performed.</p> <p>Results: The positive expression of the p16 was related with more severe lesions found on the surgical specimen ($p=0.0001$), but E6 correlation wasn't ($p=0.131$). The HPV DNA hybrid collected in the first post operative consult as a predictor of the cytological abnormalities found at 24 months follow up consult, the sensitivity of 55,6%; specificity of 84,8%, the positive predictive value is 33,3% and the negative predictive value is 93,3%.</p> <p>Conclusion: the role of p16INK4A as a highly specific marker of CIN was ratified; p16 and E6 expressions, however, does not seem to be of any prognostic value in predicting the clearance of high risk HPV after conization. Negative hybrid capture test</p>

Apêndices

	is strongly associated with free disease at outcome.
Suggested Reviewers:	Alvaro Piazzetta, MD, PhD Fellow, Harvard School alvaropi1@gmail.com Dr Piazzetta is a well qualified researcher in gynecologic oncology and work with tumor markers
	Fernando Schmitt, MD, PhD Director of Pathology, IPATIMUP fschmitt@ipatimup.pt Dr Schmitt is a well known cytopathologist with recognised experience in cervical cancer screening and molecular markers.
	Kari Syrjanen, MD, PhD Professor, Turku University Hospital Kari.Syrjanen@tyks.fi Dr Syrjanen is one of the most important investigators of HPV worldwide.

Apêndices

Cover letter

[Click here to download Cover letter: CoverLetter.doc](#)

Klaus Diedrich
Editor-in-Chief:
Archives of Gynecology and Obstetrics

Dear Dr Diedrich,

Please find in enclosed a manuscript entitled **Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision** be submitted for publication in **Archives of Gynecology and Obstetrics**. These results are original and were not concomitantly submitted for publication elsewhere. All authors listed have contributed to the information or material submitted for publication, and that all authors have read and approved the manuscript. No direct or indirect commercial financial incentive is associated with publishing the manuscript. We understand that after accepted for publication, the manuscript will become property of **Archives of Gynecology and Obstetrics**. Also, we declare that any conflict of interest, mainly financial agreement with companies whose products are alluded to in the paper.

Looking forward to hearing from you,

Adhemar Longatto-Filho, M.Sc., PhD, P.M.I.A.C.
Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14
Department of Pathology, Faculty of Medicine, São Paulo University
Dr Arnaldo Avenue, 455
Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brazil
Phone: +55 11 3061-7413

January 04, 2012

Apêndices

*Title page

[Click here to download Title page: Title page.docx](#)

Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision

Authors:

MariaTeresa Roncaglia¹
José Humberto T.G. Fregnani²
Maricy Tacla¹
Silvana Gisele Pegorin de Campos³
Hélio Hehl Caiaffa⁴
Alexandre AB'SABER⁵
Eduardo Vieira da Motta¹
Venâncio Avancini Ferreira Alves^{5,6}
Edmund C. Baracat¹
Adhemar Longatto Filho^{6,7}

¹Department of Gynecology, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

²Center for Researcher Support - Barretos Cancer Hospital, Pio XII Foundation, Barretos, Brazil.

³Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

⁴Laboratory of Medical Investigation (LIM 03), Clinics Hospital Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

⁵Department of Pathology, Clinics Hospital - University of Sao Paulo-Sao Paulo-Brazil

⁶Laboratory of Medical Investigation (LIM14), Department of Pathology, Faculty of Medicine, São Paulo University, São Paulo University, São Paulo, Brazil.

⁷Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal; ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

Correspondence:

Adhemar Longatto-Filho, M.Sc., PhD, P.M.I.A.C.
Laboratory of Medical Investigation (LIM) 14
Department of Pathology, Faculty of Medicine, São Paulo University
Dr Arnaldo Avenue, 455
Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brazil
Phone: +55 11 3061-7413

Abstract

Introduction: p16 and E6 are HPV-related proteins associated with uterine cervix high grade lesions.

Materials and methods: 114 women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) by conization with large loop excision of the transformation zone (LLETZ); after the surgery, the patients returned in 30 to 45 days for post operative evaluation. The follow-up was made every 6 months during 2 years. In each clinical visit Pap smear, colposcopy and HPV DNA test were performed. In the surgical specimen E6 and p16 immunohistochemical tests were performed.

Results: The positive expression of the p16 was related with more severe lesions found on the surgical specimen ($p=0.0001$), but E6 correlation wasn't ($p=0.131$). The HPV DNA hybrid collected in the first post operative consult as a predictor of the cytological abnormalities found at 24 months follow up consult, the sensitivity of 55,6%; specificity of 84,8%, the positive predictive value is 33,3% and the negative predictive value is 93,3%.

Conclusion: the role of p16^{INK4A} as a highly specific marker of CIN was ratified; p16 and E6 expressions, however, does not seem to be of any prognostic value in predicting the clearance of high risk HPV after conization. Negative hybrid capture test is strongly associated with free disease at outcome.

Key-words: p16, E6 protein, hybrid capture, cytology, conization

Introduction

The Human Papillomavirus (HPV) infects a large portion of the women's world population and is generally transmitted through sexual contact (1). Most of the HPV-induced lesions are cleared in 6 to 12 months after development, but a small part progresses to high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) and to cervical cancer (2). The HPV interaction with the host cells represents an important cascade of molecular alteration and synergies that culminate in the natural history of the cervical cancer development (3).

The high-risk HPV types encode two oncoproteins: the E6 and E7 oncoproteins. The oncoprotein E6 binds to the tumor suppressor p53 causing its inactivation and preventing cellular apoptosis (4). The oncoprotein E7 binds to the tumor suppressing protein pRb, keeping the continuous cell cycling without any repair check point (5). In attempt to prevent this continuous cellular cycling, the p16, one of the pRb regulators is overexpressed and accumulates in the cells (6). p16 is a protein that is expressed at very low concentrations in healthy cells, while it is highly overexpressed in cervical cancer and high grade precursor lesions. Consequently, p16 overexpression is an important marker cervical lesions and presumed useful test to be implemented for women (7). In the other hand, HPV E6 oncoprotein represents a complementary pathway involved with cell cycle deregulation where p53 is abrogated. Not surprisingly immunohistochemical expression of E6 is also currently thought to be useful for diagnosis and or prognosis proposals (8). Finally, hybrid capture 2 (hc2) test is a well-known molecular test that identifies a pool of high risk HPVs used in combination with liquid-based cytology exam, to ascertain the

HPV status in patients treated for HPV-induced lesions, undetermined cytology (ASC-US, ASC-H or AGC) and primary screening of cervical lesions (9).

The goal of this study was to characterize the p16 expression in patients treated by conization with large loop excision and compare the p16 performance with E6 immunohistochemical reaction and hc2 test in combination with the Pap test examination.

buffer” (CINTEC “Histology kit”, MTM, Germany, 1:10 solution) for 5 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with “Peroxidase blocking reagent”(CONTEC “Histology kit”, MTM, Germany), 30 ml per slide for 5 minutes. Primary p16 antibody was added (“ready-to-use”) by the time of 30 minutes at room temperature. For signal amplification it was used “Visualization reagent” (CINTEC “Histology kit”, MTM, Germany). Finally, the revelation with DAB was made with 15 ml of “DAB chromogen” and counterstained with haematoxylin.

E6 immunohistochemistry

Antigen retrieval was made with in a microwave using a solution of 10 mM citric acid pH 6,0 (Merck, USA) for three minutes as 125 °C. The endogenous peroxidase blocking was carried out with hydrogen peroxide (H₂O₂) 6%. The primary antibody E6 (C1P5) sc460, monoclonal from HPV 16 and HPV 18 E6 obtained in mouse (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) was used as 1:200 dilution. The revelation was performed with ADVANCE HRP peroxidase kit (DAKO Carpinteria, CA, USA).

Evaluation of the p16 and E6 immunostainings

The p16 reaction was evaluated as positive if nuclear or cytoplasmic immunostaining was clearly demonstrated, and scored was published previously by Longatto Filho and colleagues with slight modifications (10): negative (no reaction or ≤ 1% of positive cells), sporadic (>1% of positive ≤ 25%), moderate (between 25% and 50% positive cells), and diffuse (> 50% positive cells).

Dichotomic negative/positive evaluation was adapted to report E6 immunoreaction as suggested by Lin et al (8). A brown nuclear staining was considered as a positive reaction for HPV 16/18 E6 proteins.

Statistics

Fisher's exact test performed to compare categorical variables. To calculate the parameters of the hybrid capture accuracy (sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value), we adopted the follow-up Pap smear as gold standard. In all statistical tests the significance level considered was set at 5%.

Results

In 112 patients the HPV DNA test (© 1997 Digene Corporation, Beltsville, MD, USA) was performed before the surgical procedure. In 108 patients the HPV DNA tested positive and in four of them it tested negative prior to the procedure. Two cases have no hybrid capture DNA HPV test performed.

The cytological results prior to the surgical procedure were: 71 HSIL, 2 HSIL + AGC, 14 LSIL, 6 ASC-H, 1 ASC-H + AGC, 6 ASC-US, 1 ASC-US + AGC, 4 AGC and 9 were classified as normal cytology. The patients who had normal, ASC-US or LSIL cytology presented a NIC2/3 in biopsy samples.

The pathologic examination of the excised cervical specimen has showed the following diagnosis: 18 (15,8%) chronic cervicitis; 11 (9,6%) CIN 1; 19 (16,7%) CIN 2; 64 (56,1%) CIN 3; 1 (0,9%) CIN 3 + adenocarcinoma *in situ* (AIS) and 1 (0,9%) micro-invasive carcinoma. Table 1 depicted the results from the HPV DNA tests performed prior to the surgical procedure, and E6 and p16 immunohistochemical tests executed on the tissue samples of the surgical specimens. The relation between the expression of the E6 and p16 proteins in the surgical specimen is described in Table 2. As expected, the negative expression of the p16 was significantly related with the negative expression of the E6 oncoprotein as the positive p16 expression was also significantly related with the positive expression of the E6 oncoprotein.

The results on the p16 and E6 immunohistochemical reactions and the histopathological findings in the surgical specimens were reported on Table 3. The positive expression of the p16 was related with more severe lesions (Figure 1) found on the surgical specimen ($p=0.0001$), but E6 (Figure 2) correlation wasn't ($p=0.131$).

Table 4 exhibits the comparison among the cytological diagnoses previous to the surgeries and the HPV markers: p16 and E6 and hc2 positive status.

The accuracy values of HC in order to predict cytological abnormalities over 2-year-follow up are shown in Table 5. The hybrid capture test is being compared with the cytology. Both tests were collected at the same time during follow-up consult.

Using the result of the HPV DNA hybrid collected in the first post operative consult as a predictor of the cytological abnormalities found at 24 months follow up consult, the sensitivity of the test is 55,6%; specificity of 84,8%, the positive predictive value is 33,3% and the negative predictive value is 93,3%. Table 5 describes the accuracy of hybrid capture in every moment of the action taken in relation to cytology in the same time; differently, the data mentioned above reported the performance of hybrid capture in the first post-operative control versus cytology results in 24 months.

Discussion

We recently documented partial data from the casuistic herein studied and we found that the combination of negative cytology and negative hybrid capture test strongly excluded high grade lesions at conization follow up (11). Additionally, the data herein presented showing the characterization of p16 in a well controlled population submitted to cervix conization due the HSIL alteration, ratified the results previously reported that p16 marker is strongly expressed in high grade lesions, and have a huge potential to identify severe lesion when associated to the positive hybrid capture test (12). Furthermore, p16 was expressed in 80% of the CIN2+ biopsy-proven cases, which reinforce of potential use as a trustable marker of cervical high grade lesions.

P16 changes in the methylation profile of cervical HPV-induced lesions were recently implicated in transcription and replication control potentially triggering the neoplastic transformation (13). This is a very exciting finding because different HPV methylome are linked to the various stages of squamous epithelial differentiation, including those of high grade phenotype. However, the substantially expected enhanced expression of the viral E6 oncogene in the advanced lesions of persistent HPV infections was not observed in our series (13). Actually, the immunohistochemical expression of E6 oncoprotein have been reported for different tumors presumed induced by persistent high risk HPV infection but, not surprisingly, the frequency of the positive immunoreaction are low (14-17). For E6 immunohistochemical evaluation in cervical HPV-induced lesions we did not find any report to correlate our findings; however, the negative results of p16 and E6 reactions were combined in 75% of cases, but only 52.7% of positive reactions have

matched. This could be hypothesized as a sensitivity limitation of immunohistochemical reaction, since the CIN2+ cases were E6 positive in 37 (43,5%). Importantly emphasize that new evidences have suggested that differences in E6 variant prevalence in cervical carcinoma was not related to the carcinogenic potential of the E6 protein. Moreover, E6 variants showed comparable abilities in abrogate the growth arrest and inhibition of the induced p53 elevation. Differences were detected in the abilities to deregulate stratification and differentiation of and also modulate apoptosis and hyperactivate the Wnt signaling cascade (18).

Conclusion

Finally, our study strongly ratified the high predictive negative values of hybrid capture test during the follow up of the patients submitted to conization; in addition, a highly unexpected specificity was observed in each clinical visit. Repeated detection of high risk HPV was demonstrated to be significantly more specific but less sensitive to identifying women at risk for CIN2/3 as compared with a single time-point measurement and sensitivity is estimated to decrease and specificity increase when testing intervals were increased from 12 to 24 months (19). The variation we observed during the 24 months visit after conization did not demonstrate such important disparity.

In conclusion, the current study ratified, however, the critical function of p16^{INK4A} as a highly specific marker of CIN, but immunohistochemical expression of p16 does not seem to be of any prognostic value in predicting the clearance of high risk HPV after conization (20). p16 overexpression in human tumors as a whole is

strongly associated to high grade pre-malignant lesions, high grade tumors and senescence (21).

Conflict of interest: None.

References

1. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. [Review]. 2000 May 3;92(9):690-8.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. [Review]. 2002 May;2(5):342-50.
3. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. [Review]. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.
4. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2008;153(3):397-408.
5. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15.
6. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. [Review]. 2008 Oct;17(10):2536-45.
7. Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. [Comparative Study Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Oct;9(10):937-45.
8. Lin HP, Wang YP, Chiang CP. Expression of p53, MDM2, p21, heat shock protein 70, and HPV 16/18 E6 proteins in oral verrucous carcinoma and oral verrucous hyperplasia. *Head Neck*. [Comparative Study]. 2011 Mar;33(3):334-40.

- 1 9. Schiffman M, Wentzensen N, Wacholder S, Kinney W, Gage JC, Castle PE.
2 Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. Natl Cancer Inst.
3 2011 Mar 2;103(5):368-83.
4
5
6
7
8 10. Longatto-Filho A, Etlinger D, Pereira SM, Kanamura CT, di Loreto C, Santos
9 Gda C, et al. The association of p16(INK4A) and fragile histidine triad gene expression
10 and cervical lesions. J Low Genit Tract Dis. 2007 Jul;11(3):151-7.
11
12
13
14
15 11. Roncaglia MT, Tacla M, Vieira da Motta E, Caiaffa H, Ab'Saber A, Alves VA,
16 Longatto Filho A, Baracat EC. Evaluation of the combination of cytology and hybrid
17 capture to safely predict the high-grade lesion status of patients treated with
18 conization with large loop excision of the transformation zone. Acta Cytol. 2011; 55
19
20
21
22
23
24
25 (5):421-5.
26
27
28 12. Reuschenbach M, Clad A, von Knebel Doeberitz C, Wentzensen N, Rahmsdorf J,
29 Schaffrath F, Griesser H, Freudenberg N, von Knebel Doeberitz M. Performance of
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
13. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16
upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic
transformation. PLoS One. 2011; 6 (9):e24451.

- 1 14. Wu QJ, Guo M, Lu ZM, Li T, Qiao HZ, Ke Y. Detection of human papillomavirus-16
2 in ovarian malignancy. Br J Cancer. 2003;89(4):672-5.
3
4
- 5 15. Qi ZL, Huo X, Xu XJ, Zhang B, Du MG, Yang HW, Zheng LK, Li J, Shen ZY.
6 Relationship between HPV16/18 E6 and 53, 21WAF1, MDM2, Ki67 and cyclin D1
7 expression in esophageal squamous cell carcinoma: comparative study by using
8 tissue microarray technology. Exp Oncol. 2006;28(3):235-40.
9
- 10 16. Lawson JS, Glenn WK, Heng B, Ye Y, Tran B, Lutze-Mann L, Whitaker NJ.
11 Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. Br J Cancer.
12 2009 20;101(8):1351-6.
13
- 14 17. Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE. High-risk
15 human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their
16 association with Id-1 expression: a tissue microarray study. Br J Cancer. 2008
17 5;99(3):404-7.
18
- 19 18. Zehbe I, Lichtig H, Westerback A, Lambert PF, Tommasino M, Sherman L. Rare
20 human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. Mol
21 Cancer. 2011 Jun 24;10:77.
22
- 23 19. Marks M, Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE. Evaluation of any or type-specific
24 persistence of high-risk human papillomavirus for detecting cervical precancer. J Clin
25 Microbiol. 2011 Dec 7.
26
- 27 20. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli
28 C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. p16(INK4A) expression is related to
29 grade of cin and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance
30 after conization or disease outcome. Int J Gynecol Pathol. 2004;23(4):354-65.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 21. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J,
2
3 Ramon y Cajal S. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene
4
5 associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30(18):2087-
6
7
8 97.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Legends

Figure 1: High grade intraepithelial lesion strongly decorated with positive immunohistochemical reaction for p16 (X20).

Figure 2: High grade intraepithelial lesion strongly decorated with nuclear positive immunohistochemical reaction for E6 (X20).

Apêndices

table

[Click here to download table: Tables AGO.docx](#)

Tables

Table 1 – Results from the HPV DNA test prior to the surgical procedure, and E6 and p16 immunohistochemical test performed on the tissue sample of the surgical specimen

	Positive	Negative	Not performed	TOTAL
CH (%)	108 (94,7%)	4 (3,5%)	2 (1,8%)	114 (100%)
E6 (%)	45 (39,5%)	69 (60,5%)	-	114 (100%)
p16 (%)	74 (64,9%)	40 (35,1%)	-	114 (100%)

Apêndices

Table 2 – Correlation of p16 and E6 protein immunohistochemical expressions.

		E6		TOTAL
		Negative	Positive	
p16	Negative (%)	30 (75,0)	10 (25,0%)	40 (100%)
	Positive (%)	39 (52,7%)	35 (47,3%)	74(100%)
TOTAL		69 (60,5%)	45 (39,8%)	114 (100%)

p = 0,027

Apêndices

Table 3 – Correlation of p16 and E6 (HPV-related markers) immunohistochemical expression and histopathological findings in the surgical specimen.

		HPV-related markers	
Histopathological Diagnoses		p16	TOTAL
		Negative	Positive
	Cervicitis / CIN1 (%)	23 (79,3%)	6 (20,7%)
	CIN2 / CIN3 / AIS /Ca microinvasor (%)	17 (20,0%)	68 (80,0%)
TOTAL	p = 0,0001	40 (35,1%)	74 (64,9%)
		E6	
Histopathological Diagnoses		Negative	Positive
	Cervicitis / CIN1 (%)	21 (72,4%)	8 (27,6%)
	CIN2 / CIN3 / AIS /Ca microinvasor (%)	48 (56,5%)	37 (43,5%)
TOTAL	p = 0,131	69 (60,5%)	45 (39,5%)

AIS: in situ adenocarcinoma
Ca: squamous cells carcinoma

Apêndices

Table 4 – Comparison among the cytological diagnoses previous to the surgery and the HPV related-markers p16 and E6 and hc2 positive statues.

Cytological diagnosis	HPV-related markers						Total
	p 16		E6		hc2		
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	
Negative	5	4	6	3	9	0	9
ASC-US	2	4	3	3	5	1	6
ASC- US+AGC	0	1	0	1	1	0	1
ASC-H	4	2	4	2	6	0	6
ASC-H+AGC	1	0	1	0	1	0	1
LSIL	9	5	6	8	14	0	14
HSIL	48	23	24	47	66	3	71*
HSIL+AGC	1	1	0	2	2	0	2
AGC	3	1	2	2	4	0	4
TOTAL	74	40	45	69	108	4	
	114		114		112*		

* 2 patients didn't have hc2 test performed prior to surgical procedure

Apêndices

Table 5 - The accuracy values of hybrid capture test to predict cytological abnormalities over 2-year-follow.

Time	Positive predictive value	Negative predictive value	Sensitivity	Specificity	Total patients
6 months	50%	97,3%	83,3%	87,8%	94
12 months	42,9%	96,4%	75%	87,1%	70
18 months	33,3%	100%	100%	86%	61
24 months	54,5%	98%	85,7%	90,7%	61

Apêndices

colour figure

[Click here to download high resolution image](#)

colour figure

[Click here to download high resolution image](#)

Conflict of interest statement

[Click here to download Conflict of interest statement: Conflict of interest disclosure.pdf](#)

Conflict of Interest Disclosure Form

It is the policy of the Journal *Archives of Gynecology and Obstetrics* to ensure balance, independence, objectivity, and scientific rigor in the Journal. All authors are expected to disclose to the readers any real or apparent conflict(s) of interest that may have a direct bearing on the subject matter of the article. This pertains to relationships with pharmaceutical companies, biomedical device manufacturers or other corporation whose products or services may be related to the subject matter of the article or who have sponsored the study.

The intent of the policy is not to prevent authors with a potential conflict of interest from publication. It is merely intended that any potential conflict should be identified openly so that the readers may form their own judgements about the article with the full disclosure of the facts. It is for the readers to determine whether the authors' outside interest may reflect a possible bias in either the exposition of the conclusions presented.

The corresponding author will complete and submit this form to the Editor-in-Chief on behalf of all authors listed below.

Article Title *Characterization of p16 and E6 HPV-related proteins in uterine cervix high grade lesions of patients treated by conization with large loop excision*
 Authors *Roncaglio MT, Fregnani JHTG, Tacle M, Campos SEP, Caiaffa HH, Ab-Saber A, Motta EV, Alves VAF, Barakat EC, Longatto-Filho A*

Please state below whether any conflict of interest exists:

☒ I certify that no actual or potential conflict of interest in relation to this article exists.

☐ I certify that a conflict of interest in relation to this article exists and I define this conflict below: (please describe financial interest/arrangement with one or more organizations that could be perceived as a real or apparent conflict of interest in the context of the subject of this article):

.....

Name *ADHEMAR LONGATTO FILHO*

Signature *Ademar Longatto Filho* Date *Jan 04 - 2012*

Please upload this form together with your online manuscript submission since your manuscript cannot be assigned for review without it.

Please also insert a Conflict of Interest Statement at the end of your manuscript, preceding any Acknowledgements and References using the phrase, "We declare that we have no conflict of interest" or alternatively state your conflict of interest.