

*PROJETO PARA EXAME DE QUALIFICAÇÃO PARA
TESE DE DOUTORADO*

*INDICADORES DE DOENÇA RESIDUAL NO
SEGUIMENTO DE PACIENTES CONIZADAS
POR LESÃO INTRAEPITELIAL ESCAMOSA
DE ALTO GRAU*

Aluno: Paulo Newton Danzi Salvia

Orientadora: Professora doutora Liliana Aparecida Lucci de Ângelo Andrade.

Co-orientadora: professora doutora Christine Hackel

Data: 10/02/2004

Tópicos

Introdução

- I. O vírus
 - I.I Taxonomia e estrutura Molecular do HPV
 - II.I Tipos virais
- II. Métodos de detecção do HPV
- III. História natural da infecção pelo HPV

Projeto

- IV. Indicadores de doença residual do colo cervical
- V. Conceito
- VI. Revisão de literatura
- VII. Projeto
- VIII. Objetivos
- IX. Pacientes e Métodos
- X. Referências

I. O vírus

Taxonomia

Os *Papillomavirus* formavam um gênero que, juntamente com os *Polyomavirus*, constituíam a família **Papovaviridae** até a 7ª edição do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2004).

Melnich cunhou o nome desta família agrupando os vírus que produziam papiloma nos coelhos, os vírus que produziam o polyoma dos ratos e os vírus que produziam lesões com alterações vacuolares nos macacos, os SV40 (vacuolating vírus). Atualmente, o gênero *Papillomavirus* assinalado com o número 00.099.0.01 pelo ICTV constitui a família *Papillomaviridae* (Tabela 1) assinalada com o número 00.099 (ICTV, 2004). Este nome é derivado em parte do latim, papilla significando mamilo ou pústula e em parte do grego: o sufixo oma significa tumor; ou seja, tumor que forma mamilos ou papilas. O nome oficial da espécie é representado pelo nome do hospedeiro em itálico seguido do nome do gênero, por exemplo, *Bovine papillomavirus*, *Canine oral papillomavirus*, *Cottontail rabbit papillomavirus*, *European elk papillomavirus*, *Human papillomavirus*, *Ovine papillomavirus*.

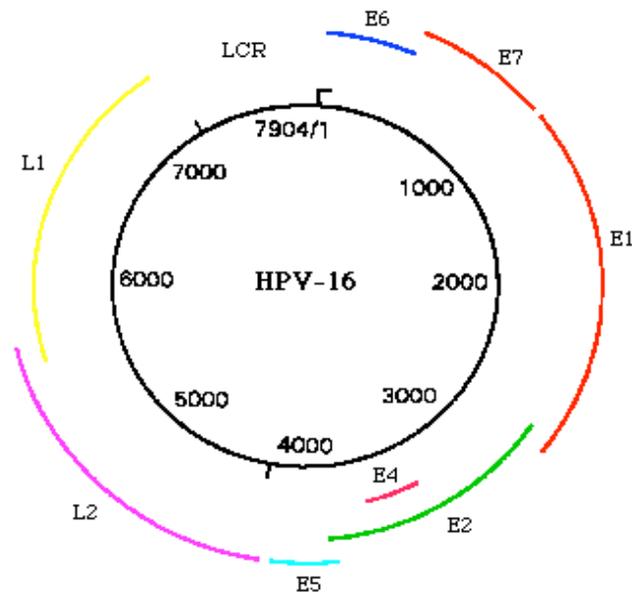
Os *Papillomavirus* são caracterizados por serem isométricos quanto à morfologia, pequenos e similares entre si à microscopia eletrônica, constituídos por fita dupla de DNA apresentando configuração genômica circular com tamanho de cerca de 8.000 pares de bases nitrogenadas (Figura 1).

Tabela 1: Quadro comparativo entre as características de diversos vírus.

Family or Unassigned genus	Nature of the genome	Presence of an envelope	Morphology	Genome Configuration	Genome Size	Host
Iridoviridae	dsDNA *	-	isometric	1 linear	140-383	Vertebrates/ Invertebrates
Phycodnaviridae	dsDNA *	-	isometric	1 linear	160-380	Algae
Baculoviridae	dsDNA *	+	bacilliform	1 circular supercoiled	80-180	Invertebrates
Herpesviridae	dsDNA *	+	isometric	1 linear	125-240	Vertebrates
Adenoviridae	dsDNA *	-	isometric	1 linear	28-45	Vertebrates
Rhizidiovirus	dsDNA *	-	isometric	1 linear	27	Fungi
Polyomaviridae	dsDNA *	-	isometric	1 circular	5	Vertebrates
Papillomaviridae	dsDNA *	-	isometric	1 circular	7- 8	Vertebrates
Polydnaviridae	dsDNA *	+	rod fusiform	multiple supercoiled	150-250	Invertebrates
Ascoviridae	dsDNA *	+	reniform	1 linear	100-180	Invertebrates
Inoviridae	ssDNA *	-	filamentou	1 + circular	7-9	Bacteria, Mycoplasmas
Bacteria, Mycoplasmas	ssDNA *	-	isometric	1 + circular	4-6	Bacteria, Spiroplasma

Figura 1: Representação esquemática do genoma do HPV-16

- LCR – Long control region
- L1 e L2 – “Late genes” : expressão tardia no ciclo viral
- E1, E2, E4, E5, E6, E7 – “Early genes” : expressão



Esses vírus possuem regiões ou genes que se expressam tardiamente. São livres de lipídios, infectam animais vertebrados, chimpanzés, macacos, cães, cavalos, alces, bois (6 tipos), ovelhas, elefantes, tartarugas, ratos, papagaios, gambás, camundongos e uma única espécie de ave chamada tentilhão (ICTV, 2004). Têm tropismos por epitélio e mucosas, sendo freqüentemente encontrados na mucosa cérvico-vaginal da mulher, onde podem permanecer por longos períodos sem causar sintomatologia ou desaparecer em função da resposta imunológica individual. Apresentam uma característica importante, o fato de serem oncogênicos nos seres humanos.

Tipos Virais

Há mais de 3.600 espécies de vírus já identificadas. Mais de 30.000 vírus estão sendo estudados no mundo segundo o ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) . Com o avanço das técnicas de detecção, elevou-se o número de seqüências de HPV encontradas na natureza (Tabela 2).

Tabela 2: Número de seqüências de HPV identificadas ao longo dos anos

▪ 1976 – 4	▪ 1986- 40
▪ 1980- 6	▪ 1989- 60
▪ 1982- 1	▪ 1997 - 77
▪ 1983- 24	▪ <u>2004- 83</u>

Atualmente existem 83 seqüências do HPV publicadas no banco de dados do NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI, 2004). Consideram-se tipos de alto e baixo risco de malignidade, cuja diferença está no papel transformante dos produtos (oncoproteínas) dos genes E6 e E7. As proteínas codificadas por E6 e E7 se ligam, respectivamente, às proteínas p53 e pRB, que são proteínas reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do câncer. Este fenômeno leva ao desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, o que provoca alterações genéticas adicionais que levam ao câncer por impedirem a apoptose, causando o fenômeno de imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco, não sendo observado nos de baixo risco. (HELT, 2002).

Além disto, foi observado que há quatro mutações do gene E6 do HPV16 que não estimulam a degradação da proteína p53, impedindo a replicação viral estável, sugerindo que esta atividade possa ser necessária para a manutenção do vírus na forma epissomal. Também foi demonstrado que o gene E6 do HPV31 tem um papel essencial na manutenção do vírus na forma epissomal em queratinócitos humanos. Uma mutação de ponto no gene E7 que impede que seu produto se ligue à proteína RB tem sido reportada como causadora da incapacidade do HPV31 de replicação estável. Porém, estudos experimentais mostram que o genoma do HPV31 que possui duas de três mutações do gene E6 que torna seu produto incapaz de induzir à degradação da proteína p53, combinada com a mutação de ponto do gene E7, foi mantido como epissoma replicante, sugerindo que o equilíbrio entre as funções de E6 e E7 é crítico para a manutenção epissomal do genoma do HPV de alto risco (PARK e ANDROPHY, 2002).

Os tipos ano-genitais mais frequentes (DOCUMENTO DE CONSENSO - LA INFECCIÓN POR PAPILOMAVIRUS) de acordo com o risco de malignidade são:

1. Alto risco : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82;
2. Potencialmente oncogênicos: 26, 53 e 66
3. Baixo Risco : 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.

Figura 2: Sequência do gene L1 do HPV 16 (5526 a 7154, sentido 5T→3T)

Região de anelização dos primers:

* My09 e My11 (6583-6602/7015-7034) - - →

* GP5+ e GP6+ (6624-6649/6719-6746) →

```
5521 tatagttcca gggctctccac aatatacaat tattgctgat gcaggtgact tttatttaca
5581 tcctagttat tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatatTTTT tttcagatgt
5641 ctctttggct gcctagttag gccactgtct acttgcctcc tgtcccagta tctaagggtg
5701 taagcacgga tgaatatggt gcacgcacaa acatatatta tcatgcagga acatccagac
5761 tacttgcagt tggacatccc tattttccta ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag
5821 ttcttaaagt atcaggatta caatacaggg tatttagaat acatttacct gaccccaata
5881 agtttggttt tcctgacacc tcattttata atccagatac acagcggctg gtttggcct
5941 gtgtaggtgt tgaggtaggt cgtggtcagc cattaggtgt gggcattagt ggccatcctt
6001 tattaataa attggatgac acagaaaatg ctagtgccta tgcagcaaat gcaggtgtgg
6061 ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaaacaca attgtgttta attggttga
6121 aaccacctat aggggaacac tggggcaaag gatcccatg taccaatggt gcagtaaact
6181 caggtgattg tccaccatta gagttaataa acacagttat tcaggatggt gatatggttc
6241 aactggctt tggtgctatg gactttacta cattacaggc taacaaaagt gaagttccac
6301 tggatatttg tacatctatt tgcaaatac cagattatat taaaatggtg tcagaacat
6361 atggcgacag cttatTTTT tatttacgaa ggaacaaat gtttgttaga catttatta
6421 atagggctgg tactgttggg gaaaatgtac cagacgattt atacattaaa ggctctgggt
6481 ctactgcaa ttagccagt tcaaattatt ttctacacc tagtggttct atggttacct
6541 ctgatgccca aatattcaat aaaccttatt ggttacaacg agcacagggc cacaataatg
6601 gcatttggtg gggtaaccaa ctatttgttta ctgttgttga tactacacgc agtacaata
6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaataact aactttaagg
6721 agtacctacg acatggggag gaatatgatt tacagttat ttttcaactg tgcaaaataa
6781 ccttaactgc agacgttatg acatacatac attctatgaa ttccactatt ttggaggact
6841 ggaattttgg tctacaacct ccccaggag gcacactaga agatacttat aggtttgtaa
6901 cccaggcaat tgcttgtcaa aacatacac ctccagcacc taaagaagat gatcccccta
6961 aaaaatacac tttttgggaa gtaaatttaa aggaaaagtt ttctgcagac ctagatcagt
7021 ttcctttagg acgcaaattt ttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaatttacat
7081 taggaaaacg aaaagctaca cccaccacct catctacctc tacaactgct aaacgcaaaa
7141 aacgtaagct gtaagtattg tatgtatggt gaattaggtg tgtttgttgt gtatatgttt
```

II. Técnicas de detecção do HPV

Há várias técnicas de detecção de DNA viral, entre os quais destacamos:

1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) que pode ser realizada “in situ” , ou seja, em lâminas provenientes de biopsia ou citologia ou “in filtro” a partir de líquidos e secreções..
2. Hibridização: “in situ” ou “in filtro”.
3. Imunoistoquímica: “in situ”
4. Captura de Híbridos: somente realizada “in filtro”.

Há diferenças entre as técnicas que estão sumarizadas na tabela 3. De um modo geral, a captura de híbridos é um método de fácil execução e bastante sensível, utilizando amostra líquida. Permite a detecção por grupos de risco baseada na pesquisa de 18 sondas dos HPVs mais freqüentes, além de permitir avaliação de carga viral. O grupo A possui sondas para os HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44), e o grupo B, sondas para os HPV de risco intermediário ou alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Sua sensibilidade é de 1 pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Porém pode apresentar reações cruzadas. Há estudos comparativos com o PCR, demonstrando que as sondas usadas na Captura Híbrida de segunda geração (HC2) para HPVs de alto risco detectaram HPVs tipos 6, 11, 40, 42, 53, 55, 66, 70, MM4, MM7, MM8 e MM9., que são de baixo risco, portanto, caracterizando um sub-grupo com resultado falso positivo (SOLOMON et al., 2001).

A técnica de captura híbrida não permite especificar o tipo viral, não detectando tipos que possam estar presentes na amostra e que não tenham homologia com as sondas testadas, além de não preservar a morfologia dos tecidos, já que necessita de amostra líquida. O princípio desta técnica se baseia em uma reação de hibridização molecular que utiliza sondas não radioativas com amplificação da detecção de híbridos por quimioluminescência. A reação é executada em cinco fases:

1ª fase: Digestão/desnaturação, com hidróxido de sódio, a 65°C durante 45 minutos.

2ª fase: Hibridização, onde os espécimes contendo DNA viral se hibridizam com um coquetel de sondas para RNA-HPV, que são seqüências longas para RNA de vários tipos virais. Esta fase é realizada a 65°C, durante 60 minutos.

3ª fase: Captura de híbridos, onde o material contendo os híbridos é transferido para um recipiente cuja parede é revestida por anticorpo específico contra os híbridos, imobilizando-os. Esta fase ocorre durante 60 minutos, a 23°C.

4ª fase: Reação com conjugado, onde os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos para RNA/DNA conjugados à fosfatase alcalina. Esta fase ocorre durante 30 minutos, a 23°C.

5ª fase: Reação com substrato: Após a reação com conjugado, o excesso de material é desprezado, sendo o microtubo lavado com uma solução tampão e submetido à reação com uma substância quimioluminescente (o substrato), que sofre ação da fosfatase alcalina, durante 15 minutos a 23°C, sendo o material colocado no aparelho específico para a leitura.

A luz emitida é medida como unidade relativa de luz (URL) no luminômetro. Estes valores são comparados com controles positivos e negativos corridos em triplicata. A intensidade de luz emitida denota a presença ou ausência do DNA-alvo nos espécimes e a quantificação do vírus. A medida URL igual ou acima do valor de corte (controle positivo) indica a presença da sequência específica de DNA-HPV no espécime. Uma URL menor que o valor de corte indica ausência de DNA-HPV no espécime.

A hibridização “in situ” e imunoistoquímica são técnicas bastante específicas, porém pouco sensíveis, o que é explicado por necessitarem ou de DNA íntegro em grande quantidade no tecido no caso da hibridização “in situ” ou de seqüências virais com capsídeo íntegro no caso da imunoistoquímica. Ambas têm a vantagem de preservar a morfologia do tecido, permitindo marcar a célula infectada. A técnica de imunoistoquímica detecta antígenos do capsídeo viral através de um anticorpo, que, a seguir, é revelado por um sistema imunoenzimático (geralmente peroxidase) que propicia coloração permanente com corantes do tipo da diaminobenzidina. Esta técnica permite detectar apenas se existe o HPV no tecido, não sendo específica para nenhum tipo em particular, nem mesmo para os HPVs humanos pois o anticorpo reage cruzadamente com o Papilomavírus bovino. (ANDRADE et al, 1991; VASSALLO et al, 1999). A técnica de hibridização “in situ” detecta segmentos do DNA viral presentes na célula infectada através de sondas de DNA marcadas geralmente com fluoresceína ou biotina. Após a hibridização realizada, expondo-se a célula-teste com a sonda, a reação é revelada por um sistema imunoenzimático (geralmente peroxidase) que propicia coloração

permanente com corantes do tipo da diaminobenzidina (semelhante ao estudo imunistoquímico). A coloração específica se dá no núcleo das células onde o vírus se replica. Esta técnica permite detectar o tipo infectante, havendo sondas comerciais para os HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33 etc., e um “coquetel” para vários tipos, denominada sonda “wide spectrum” ou de amplo espectro. (VASSALLO et al, 1999; VASSALLO et al, 2000).

Tabela 3: Quadro comparativo entre as técnicas

	Captura de Híbridos (HC2)	PCR	IMPX / HIS
Execução	Simples	Complexa Tempo variado	Complexa Rápida (24h)
Morfologia do tecido	Não preserva	Não preserva	Preserva
Conservação	Líquido	Líquido	Lâminas
Carga Viral	Sim	Não	Não
Sensibilidade	Boa	Padrão ouro	Moderada
% Detecção/tipo	18 sondas investigadas	Todos os tipos (100%)	Sondas Investigadas
Forma de detecção	Por grupos de risco	Tipo específico Ex: HPV 16	Tipo específico
Reações cruzadas	Sim	Não	Não

A reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase chain reaction) é um método de síntese de ácidos nucleicos pelo qual um segmento específico de DNA é replicado. Pode ser realizada “in situ” a partir de lâminas de exame histológico ou citológico ou “in filtro” a partir de líquidos provenientes de secreções, sangue ou líquido de cavidades. Para que ela ocorra, são necessários:

1. SUBSTRATO que é o DNA extraído a partir de diversos tipos de amostras: secreções: (cérvico-vaginal,oral,etc), líquido amniótico (utilizado na investigação de paternidade e na detecção de doenças genéticas), sangue (manchas na cena do crime), tecido fresco, material formolizado, material parafinado, bulbo capilar, ossos.

2. REAGENTES:

a) Um par de segmentos iniciadores também chamados de “primers”: pequenas seqüências de DNA (oligonucleotídeos) que iniciam a reação, se forem complementares a uma região do DNA molde,

b) Desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs): unidades do DNA, Taq DNA polimerase: enzima que adiciona os dNTPs às novas fitas, sintetizadas, por extensão dos “primers”.

Prepara-se uma solução em um microtubo que será colocado em um termociclador, aparelho utilizado para automatizar ciclos de elevação e diminuição da temperatura com o objetivo de desnaturar as fitas de DNA na primeira fase, atingindo, logo após, a temperatura ideal para anelamento (ou hibridização). Estes, se forem complementares, se ligarão com uma região específica da fita molde e darão início à formação de uma nova fita de DNA

complementar à mesma. Esses dois pares de “primers” atuam em sentidos opostos, um para cada fita molde e a amplificação sempre se dá no sentido 5’ 3’. Ao final de vários ciclos, obtém-se um fragmento de tamanho definido que pode ser visualizado sob iluminação de UV após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo. A enzima termoestável que liga os nucleotídeos à fita molde é chamada de Taq DNA polimerase, cujo nome se deriva da bactéria *Thermus aquaticus* de onde é proveniente. Em suma, a reação ocorre basicamente em três fases:

1. Desnaturação do DNA que ocorre entre 94 e 96°C.
2. Anelamento dos “primers” com as seqüências complementares do DNA molde entre 50 a 65 °C.
3. Extensão, por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase a 72°C.

Em relação ao PCR do material parafinado, “in situ” ou “in filtro”, há estudos mostrando que a fixação em formaldeído produz alterações na estrutura do DNA do tecido, dependendo do tipo de tecido e tempo de fixação. Estas alterações na estrutura do DNA são mais importantes que a própria quantidade de DNA extraída da amostra em termos de performance do PCR. A eficiência da amplificação está diretamente relacionada ao tamanho dos produtos a serem amplificados exatamente por causa destas alterações de estrutura. Somente 8 horas de fixação em formaldeído são suficientes para inibir a amplificação de seqüências maiores que 421 pares de bases (KARLSEN et al.,1994).

III História natural da infecção pelo HPV

As evidências de que infecções pelo HPV se relacionam ao câncer cervical incluem um corpo grande e consistente de estudos (BOSCH et al., 1995). A associação foi reconhecida por várias revisões desde os anos 90 (HO et al., 1998; GU et al., 1997). Estudos de coorte demonstraram que a presença e persistência do DNA-HPV são necessárias para o desenvolvimento da neoplasia cervical e o desaparecimento do DNA viral prediz a regressão da neoplasia (International Agency for Research on Cancer - IARC, 2002; NOBBENHUIS et al., 1999; KOUTSKY et al., 1992; WALLIN et al., 1999). A história natural da maioria dos cânceres cervicais se inicia a partir de uma doença infecciosa associada ao HPV que leva a anomalias celulares do epitélio ou lesões intraepiteliais propriamente ditas. A neoplasia intraepitelial cervical grau III (NIC III) é o último estágio antes do câncer. Por este motivo, este estágio costuma ser usado como “endpoint” em vários estudos epidemiológicos, a fim de se testar novas tecnologias, candidatas a se tornarem ferramentas epidemiológicas na prevenção do câncer cervical, embora o “endpoint” verdadeiro seja o estágio de câncer cervical propriamente dito ou de óbito por câncer cervical (CUZICK, 2001). Vários estudos mostraram que o HPV está tão relacionado às lesões chamadas de precursoras (NIC) quanto aos cânceres invasivos avançados (SCHIFFMAN et al., 1993; MUNOZ et al., 1993; OLSEN et al., 1995; KJAER et al., 1996; HERRERO et al., 2000; SCHIFFMAN et al., 2000). Com o desenvolvimento dos métodos de detecção do DNA viral em amostras cervicais, a prevalência de DNA do HPV em lesões de intraepiteliais

de baixo e alto grau elevou-se a níveis de 80-90% (SOLOMON et al., 2001). Além disto, após o desenvolvimento de novos “primers” que são segmentos de DNA iniciadores da reação para a detecção do DNA do HPV através da PCR, ficou claro que o Papilomavírus Humano tem um importante papel no desenvolvimento do câncer cervical porque, entre outras evidências, provou-se que quase todas as amostras de câncer cervical contêm DNA do HPV (BOSCH et al., 1995; ROLON et al., 2000). Assim, há uma evidência forte que o DNA do HPV parece ser um fator necessário para o aparecimento de câncer cervical (SOLOMON et al., 2001; BOSCH et al., 1995).

Sabe-se que mulheres portadoras do DNA do HPV têm risco aumentado em cerca de 100 vezes para o desenvolvimento do câncer e, especificamente, portar o HVP18 representa um risco aumentado em 1000 vezes para o desenvolvimento do adenocarcinoma cervical em relação às mulheres que não são portadoras deste vírus (BOSCH et al., 2001). Dados do estudo longitudinal LUDWIG-MCGILL (SCHLECHT N.F et al., 2001) realizado em São Paulo, com 2.404 mulheres mostraram que aquelas infectadas por um período de 8 meses, comparadas com as sem infecção, com 2 exames negativos, têm risco relativo de cerca de 11 a 12 vezes maior para o desenvolvimento de lesão intraepitelial escamosa citológica de alto grau.

Dois fatores são importantes para a progressão da lesão intraepitelial a câncer cervical:

1. PRESENÇA DO HPV ONCOGÊNICO (DE ALTO RISCO)
2. INFECÇÃO PERSISTENTE

PERSISTÊNCIA VIRAL

SCHLECHT et al. (2001) publicaram um estudo sobre a persistência da infecção pelo Papilomavírus Humano como fator preditivo de neoplasia intraepitelial cervical, coletando dados do estudo longitudinal LUDWIG-MCGILL realizado em São Paulo com 1611 mulheres com citologia normal, seguidas entre 1993 e 1997, posteriormente até o ano 2000. As citologias eram realizadas de 4 em 4 meses no primeiro ano e duas vezes ao ano a partir do segundo ano. A incidência de lesão intraepitelial escamosa em mulheres livres de HPV nas primeiras duas visitas foi de 0,73 por mil mulheres–meses contra 8,68 em mulheres com infecção persistente pelos HPVs tipo 16 ou 18 em ambas as visitas. O risco relativo para o desenvolvimento de lesão intraepitelial escamosa em mulheres com infecção persistente pelo HPV oncogênico em relação às mulheres negativas em ambas as visitas iniciais foi de 10,19 (95% CI, 5,9 – 17,6). Segundo DOCUMENTO DE CONSENSO - LA INFECCIÓN POR PAPILOMAVIRUS (2004) publicado pela ASSOCIAÇÃO ESPANHOLA DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA, há um forte aumento da incidência de câncer cervical concomitantemente a uma forte diminuição da prevalência de infecção pelo HPV em mulheres a partir dos 30 anos de idade,

pressupondo-se que o fator mais importante para o desenvolvimento do câncer seja a persistência da infecção viral que ocorre nestas mulheres acima de 30 anos contraída em anos anteriores, que, por alguma razão, não foi resolvida pelo organismo.

CARGA VIRAL

CLAVEL et al. (2001) estudaram 7932 mulheres na França aplicando teste de DNA de HPV com a finalidade de rastreamento populacional primário para a detecção de lesão intraepitelial escamosa de alto grau e compararam com o rastreamento tradicional feito com a citologia oncótica cervical bem como a citologia oncótica de base líquida. Concluíram que a sensibilidade para detecção de NIC III foi de 100% para o teste HPV-DNA contra 68,8% para a citologia convencional e 85,6% para a citologia de base líquida. Além disso, a carga viral não foi o fator considerado fator seguro para predizer lesão de alto grau em esfregaços normais.

LORINCZ et al. (2002) publicaram um estudo coorte com 20.810 mulheres seguidas por 10 anos com rastreamento citológico e teste de DNA. O objetivo era verificar se a carga viral prediz risco futuro de NIC III ou câncer. Foi feita estratificação em 4 grupos, divididos pela unidade relativa de luz normalizada um pg controle HPV 16: os grupos foram divididos de 1 a 10, de 10 a 100, 100 a 1000 e maior e igual a 1000. Concluiu-se que a presença do HPV aumenta fortemente o risco para NIC III e câncer e que a carga viral elevada não prediz o risco de NIC III ou câncer.

PROGRESSÃO

OSTOR (1993) publicou um trabalho de revisão da literatura desde 1950 com um total 3.529 casos em relação à evolução espontânea das lesões intraepiteliais escamosas, com as taxas de regressão, persistência, progressão para NIC III e progressão para câncer invasivo, tendo encontrado uma taxa de 12% de progressão para câncer invasivo a partir do NIC III (Tabela 7).

SYRJANEN et al. (1996) estudaram 530 mulheres com 14 anos de seguimento, mostrando taxa de regressão espontânea de 66,7% para os casos com infecção pelo HPV associada a qualquer NIC e 55,7% para os casos com infecção pelo HPV associada a NIC I. O mesmo estudo mostra taxa de progressão espontânea de 6,3% para os casos com infecção pelo HPV associado a qualquer NIC e 14,2% para os casos associados a NIC I.

MELNIKOW et al. (1998) publicaram uma revisão da história natural das lesões intraepiteliais escamosas, selecionando 15 de 81 estudos com um total de 27.929 pacientes, tendo encontrado taxa de progressão média de lesão de alto grau para câncer em 24 meses de 1,44% (Tabela 8).

FORSMO et al. (1997) publicaram um estudo feito na Noruega sobre o efeito do tratamento de NIC III na incidência do câncer cervical efetuado entre 1965 e 1992. Concluíram que mulheres sem nenhuma intervenção apresentaram probabilidade de progressão de NIC III para câncer invasivo de 20% em um tempo médio de 16 anos, ou seja 4/5 das mulheres com NIC III não progrediriam. A progressão de NIC III para câncer depende de fatores

promotores, entre os quais se destacam: persistência viral, reativação da infecção, oncoproteínas, fatores cromossômicos do hospedeiro.

Tabela 7: Evolução espontânea das SIL referentes ao estudo de OSTOR

	NIC I	NIC II	NIC III
Regressão	57%	43%	33%
Persistência	32%	35%	
Progressão para NIC III	11%	22%	
Progressão para Cancer Invasivo	1%	5%	12%

Tabela 8: Taxas de progressão e regressão referentes ao estudo de MELNIKOW e colaboradores.

CO	Progressão a HSIL	Progressão a CÂNCER	Regressão
ASCUS	7.13%	0,25%	68.19%
LSIL	<u>20.81%</u>	0,15%	47.39%
HSIL	23,37%	<u>1,44%</u>	35.03%

IV. Indicadores de doença residual do colo cervical

Diante do que foi exposto, frente a um diagnóstico de NIC III histológica, a maioria dos serviços tende a adotar a conduta de conização cervical, a fim de impedir a progressão da doença. Uma vez realizado o procedimento, é necessário que se faça o seguimento da paciente pois existe uma chance de ocorrer recidiva da doença, ou porque o tecido doente ou infectado não tenha sido completamente extirpado, ou devido a uma re-infecção. As margens cirúrgicas, se estiverem comprometidas são utilizadas, habitualmente, como indicador de doença residual, pois histologicamente indica que o tecido doente não foi completamente retirado. Contudo existem recentes estudos mostrando que nem sempre a paciente com comprometimento das margens desenvolverá recidiva da doença e, particularmente se a margem for ectocervical, não tem valor preditivo. Por outro lado, pode ocorrer recidiva entre mulheres com margens livres, portanto, estas também não estão, totalmente livres da doença. Existem situações em que se deseja preservar o futuro obstétrico da paciente jovem que foi submetida a conização cervical e teve exame histopatológico com margens comprometidas no cone. Este fato tem levado os pesquisadores a buscar indicadores de doença residual que possam substituir a situação das margens. Habitualmente o seguimento se faz com citologia oncótica cervical periódica e colposcopia. Recentemente alguns estudos têm proposto o acréscimo de novos exames como o teste de DNA de HPV, pois há evidências de que tem grande valor preditivo positivo e negativo para doença residual.

Porém, se a presença do HPV está bem estabelecida como indicador de doença residual, há controvérsias, contudo, em relação a carga viral. Portanto, há necessidade de novos estudos que venham auxiliar o conhecimento e estabelecimento destes novos marcadores.

V. *Conceito*

Doença residual é a doença que permaneceu na paciente após a ablação cirúrgica (conização cervical) ter sido efetuada. Alguns estudos consideram doença residual quando a recidiva ocorre no primeiro ano após a cirurgia e recorrência quando ocorre após pelo menos dois exames citológicos negativos, os quais foram realizados três e seis meses após a cirurgia (DEBARGE, 2003).

VI. REVISÃO DE LITERATURA

GURGEL et al. (1997) estudaram doença residual que ocorreu em pacientes histerectomizadas após conização por carcinoma microinvasivo, com 163 casos de 1967 a 1994, correlacionando com os seguintes achados histopatológicos na peça proveniente do cone cervical: profundidade de invasão, extensão lateral da lesão, lesão unifocal ou extensa, invasão vascular, sinais morfológicos de infecção pelo HPV, margens cirúrgicas livres ou comprometidas. Concluíram que a neoplasia residual na histerectomia foi mais freqüente quanto as margens no cone estavam comprometidas ou quando havia sinais morfológicos de infecção pelo HPV.

COSTA et al. (2002) estudaram 699 pacientes conizadas por eletrocirurgia. Encontraram doença residual em 38 pacientes (5,4%). Estudaram os fatores que tiveram influência ou foram preditivos para doença residual, entre eles idade da paciente, período de tempo, tamanho da lesão, sítio da lesão, grau da neoplasia intraepitelial cervical (NIC), tamanho do cone, profundidade do cone e margens cirúrgicas, sendo que nenhum destes citados teve influência significativa em predizer doença residual.

JAIN et al. (2001) estudaram 77 pacientes conizadas com diagnóstico de NIC III. Realizaram teste de DNA com captura de híbridos da segunda geração (HC II) antes e depois da conização. Margens positivas foram definidas como margens comprometidas no cone ou curetagem endocervical positiva (com NIC III). Das 77 pacientes, 47 (59,5%) apresentaram margens comprometidas. Destas (com margens comprometidas), houve positividade para DNA de HPV

em 37 (78,7%) e negatividade em 10 (21,3%). A doença residual ocorreu em 31 das 47 pacientes com margens comprometidas e não houve doença residual nos casos HPV-DNA negativos. Das 32 (59,5%) pacientes com margens negativas ou livres, HPV-DNA foi positivo em 7 (22%) e negativo em 25 (78%). Ocorreu doença residual em 1 destas 7 pacientes HPV-DNA positiva.

FERENCZY (2001) relatou estudo com 184 mulheres das quais 29 (15,8%) apresentaram doença residual (NIC II/III pós cone). Neste estudo, a sensibilidade para doença residual foi de 62% para a citologia oncótica cervical convencional contra 90% para o teste HPV-DNA. O valor preditivo negativo de 2 exames associados, citologia oncótica convencional normal e teste de DNA HPV negativo foi de 99%. O mesmo autor relatou uma revisão de vários trabalhos, concluindo que se após a uma conização, o diagnóstico for de carcinoma invasor, a recidiva tem chance de ocorrer entre 50 e 60% das pacientes. Contudo, se o diagnóstico for de lesão intraepitelial escamosa (LIE), a chance de não ocorrer doença residual varia entre 20 a 80% . Além disto, destas pacientes LIE, mesmo com margens livres, 4% terão doença residual no seguimento. O autor conclui que o teste de DNA de HPV tem sensibilidade elevada, valor preditivo negativo elevado e as margens cirúrgicas não têm valor preditivo para doença residual.

CUZICK (2001) relatou uma revisão de nove estudos de recorrência de lesão intraepitelial escamosa após conização. Conclui que 80 a 100% das mulheres que apresentaram recorrência são HPV-DNA positivas e mulheres HPV-DNA negativas provavelmente não terão doença recorrente.

NEGRI et al. (2003) estudaram 62 mulheres submetidas a uma excisão larga da zona de transformação. O controle foi feito mediante teste de HPV-DNA com HC II para detecção de DNA e medição de carga viral e com citologia oncótica de base líquida imediatamente após a cirurgia e entre 6 e 9 meses após. O objetivo foi avaliar se o teste de HPV era útil para identificar paciente com alto risco para doença residual. Neste estudo, 19/62 pacientes (30,6%) tiveram margem comprometida ou com distância inferior a 0,5 mm e 21 de 61 pacientes (33,9%) tiveram teste de HPV DNA positivo. No seguimento citológico, a atipia de célula escamosa foi observada em 65% dos casos de HPV-DNA positivos. Todos os casos HPV-DNA negativos tiveram citologia oncótica dentro dos limites da normalidade. Conclui que o teste de HPV-DNA na cirurgia e no seguimento é bem adequado para detectar infecção residual pelo HPV mesmo em mulheres com margens livres, podendo substituir a curetagem endocervical e auxiliar na distinção entre verdadeira doença residual e re-infecções. O autor relata que entre as 41 (66,1%) pacientes HPV-DNA negativas de um total de 62, 12 se tornaram HPV-DNA positivas no controle e das 21 (33,9%) pacientes HPV-DNA positivas, 13 se tornaram HPV-DNA negativas no controle.

JOHNSON et al. (2003) estudaram 702 mulheres que foram seguidas por trinta meses após excisão cervical para saber qual das margens, ecto ou endocervical tem valor preditivo para doença residual. Conclui que o risco de persistência de anormalidade histológica foi o dobro para as pacientes com margens endocervicais comprometidas e/ou evidência de HPV-DNA em relação ao grupo com margens negativas sem evidência de HPV-DNA. A margem

ectocervical comprometida ou o grau de NIC não estiveram associados com aumento de risco para doença residual.

BAR-AM et al. (2003) estudaram 67 mulheres conizadas por NIC II ou III as quais foram seguidas por 63 meses com citologia oncótica cervical convencional e teste de HPV-DNA. Pacientes com duas citologias positivas ou teste HPV-DNA positivo foram encaminhadas para colposcopia com biopsia dirigida. Se o resultado da biopsia fosse NIC II ou III ou se a paciente apresentasse carga viral alta, esta era conduzida para reconização. Foram encaminhadas para colposcopia 29 (43,2%) pacientes com citologia alterada, qualquer que fosse a alteração, ou HPV-DNA positivo, das quais 11 (37,9%) tiveram diagnóstico de lesão intraepitelial escamosa de alto grau ou carga viral elevada e foram conduzidas à reconização e histerectomia. O autor conclui que a carga viral alta teve valor preditivo positivo (VPP) de 100% para qualquer NIC e 90% para NIC II ou III; a lesão intraepitelial escamosa de baixo grau detectada pela citologia teve VPP de 60% para qualquer NIC e de 15% para NIC II ou III. Das pacientes com diagnósticos NIC II ou III, 5 de 9 casos foram identificados pela citologia oncótica e 4 pelo teste de HPV-DNA. Conclui que pacientes com carga viral alta, independente do resultado da citologia oncótica cervical se lesão intraepitelial escamosa de baixo grau ou normal apresentam 80% de risco para NIC II ou III. Portanto, adicionar o teste de HPV-DNA com carga viral no protocolo de seguimento de pacientes conizadas por NIC II ou III pode auxiliar na detecção de lesão intraepitelial escamosa de alto grau residual entre pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau citológica ou

com citologia oncótica cervical normal e tem a vantagem de diminuir o número de colposcopias e de procedimentos cirúrgicos adicionais.

DEBARGE et al. (2003) avaliaram o teste de DNA para HPV após conização por ablação eletrocirúrgica por lesão intraepitelial escamosa de alto grau em 205 pacientes. O teste de HPV-DNA foi realizado antes da conização e três meses após o procedimento. Foi feito seguimento com intervalos de três meses. Doença residual foi considerada como a lesão histológica comprovada que ocorreu dentro do primeiro ano após o tratamento primário e doença recorrente, quando ocorreu no período posterior ao de duas citologias oncóticas cervicais normais realizadas no seguimento, três e seis meses após a conização. O teste de HPV-DNA positivo antes da conização ocorreu em 94,1% das pacientes e em 34,6% das pacientes após a conização. As margens comprometidas ocorreram em 36,1%, doença residual em 13,2% e doença recorrente (após 18 meses) em 2% das pacientes. As pacientes com margens comprometidas tiveram mais doença residual que pacientes com margens livres. Ocorreu correlação entre HPV-DNA antes do tratamento e doença residual. Houve uma correlação entre o teste de HPV-DNA após o tratamento e doença residual, com sensibilidade de 81% para doença residual e 100% para recorrente, valor preditivo negativo de 96% para doença residual e 100% para recorrência.

VII. Projeto

Estudo prospectivo de 1000 pacientes com diagnóstico histopatológico de NIC II ou III com indicação de conização cervical para avaliação dos indicadores de doença residual.

VIII. Objetivos

Objetivos Gerais

Definir e comparar os indicadores de doenças residual cervical após conização cervical na lesão intraepitelial escamosa de alto grau e comparar os resultados com dados da literatura.

Objetivos Específicos

Determinar risco relativo para doença residual, estabelecendo valores preditivos positivos e negativos para os seguintes fatores isoladamente ou combinados:

1. Situação das margens cirúrgicas ecto e endocervicais,
2. Grau da lesão,
3. Atipia na citologia oncótica cervical tradicional,
4. Presença de DNA de HPV na amostra coletada após a cirurgia no seguimento,
5. Carga viral

IX. Pacientes e métodos

Primeira fase (previsão de 1 mês) : solicitação de aprovação do projeto pela comissão de ética institucional.

Segunda fase (previsão de 2 meses) : envio do projeto aos órgãos fomentadores para buscar financiamento.

Terceira fase (previsão de 2 meses): convite a serviços de referência em oncologia para participar da pesquisa e estabelecimento de protocolo definindo critérios de inclusão, de exclusão e de procedimentos frente aos achados laboratoriais.

Quarta fase (previsão de 1 mês): escolha dos laboratórios onde serão processadas as amostras.

Quinta fase (previsão de 1 ano): eleição das pacientes, coleta de assinatura convidando para participar da pesquisa e autorizando à manipulação das amostras com a finalidade de pesquisa.

Sexta fase (previsão de 1 ano - concomitante à fase anterior): processamento da amostra proveniente da conização , leitura das lâminas com determinação do grau da lesão e situação das margens.

Sétima fase (previsão de 1 ano - concomitante à fase anterior): coleta das amostras para citologia oncótica convencional, citologia oncótica de base líquida, HC II e PCR imediatamente após a cirurgia e com 3 e 6 meses após, no seguimento.

Oitava fase (previsão de 1 ano - concomitante à fase anterior): processamento das amostras e leitura dos resultados.

Nona fase (previsão de 1 ano): Coleta das amostras provenientes da procedimentos pós-cone (biópsias, re-cones ou hysterectomias), processamento e leitura das lâminas.

Décima fase (previsão de 2 meses): análise estatística e redação dos resultados.

Para este estudo, utilizaremos dois pares de “primers” para detecção do HPV e um terceiro par para amplificação do gene da beta globina como controle interno da reação: MY09/MY11, GP5+/GP6+, KM29/RS42 respectivamente (Tabela 4). Os dois primeiros pares flanqueiam uma seqüência que pertence a uma região chamada de L1 do genoma viral, cujo nome é a abreviatura de “Late”, por ser uma região que se expressa tardiamente no ciclo vital do vírus. Esta região é uma região conservada, estando presente em todos os tipos virais, portanto, serve como marcadora, prestando-se à detecção de todos os tipos virais. O par de “primers” MY09/11 flanqueia uma seqüência de cerca de 450 pares de bases nitrogenadas (pb), enquanto que o par GP5+/GP6+, uma seqüência de cerca de 150 pb, interna à seqüência flanqueada pelo grupo MY (Figura 2). O par GP trabalha a uma temperatura abaixo de sua temperatura ideal, ou em baixa estringência, o que permite seu anelamento com as fitas moldes, mesmo que não haja total complementaridade, permitindo a detecção de diversos tipos virais que possuem leves alterações em suas seqüências na região L1, embora a maior parte dela seja conservada (Tabelas 5 e 6). O grupo MY é, na verdade, composto por 25 oligonucleotídeos denominados

degenerados, por serem sintetizados com substituições nucleotídicas que permitem que esta mistura de “primers” MY seja capaz de identificar um amplo espectro de tipos de HPV (Tabela 4). O grupo GP5+/GP6+ consiste de uma seqüência fixa de nucleotídeos para cada “primer” e detecta um amplo espectro de tipos de HPV, usando baixa temperatura de anelização durante o PCR (QU et al., 1997 E DE RODA-HUSMAN et al., 1995).

Tabela 4: Seqüências dos primers genéricos para detecção do HPV e de beta globina.

CÓDIGO	NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA
KM29	20	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG
RS42	20	GCTCACTCAGTGTGGCAAAG
MY11	20	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
MY09	20	CGTCCMARRGGAWACTGATC
GP5+	23	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP6+	25	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC

- Legenda: M= A/C, R= A/G, W= A/T, Y= C/T

Tabela 5: Número de bases não pareadas por tipo de HPV

	GP 5	GP 6
HPV 6b	0	1
HPV 11	0	0
HPV 16	2	0
HPV 18	0	1
HPV 31	0	2
HPV 33	0	2

XX. REFERÊNCIAS:

ANDRADE L. A. L. A., OYAKAWA N., VASSALLO J. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus infection in condylomatous and preneoplastic lesions of the lower female genital tract. **Pathologica**, 83: 301-306, 1991.

BAR-AM A, GAMZU R, LEVIN I, FAINARU O, NIV J, ALMOG B. Follow-up by combined cytology and human papillomavirus testing for patients post-cone biopsy: results of a long-term follow-up. **Gynecol Oncol**, 91:149-53, 2003.

BOSCH F.X.; MANOS M.; MUNOZ N.; SHERMAN M.; JANSEN A.M.; PETO et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study. **J Natl Cancer Inst**, 87:796-802, 1995.

CLAVEL C, MASURE M, BORY JP, PUTAUD I, MANGEONJEAN C, LORENZATO M, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. **Br J Cancer**, 15: 84: 1616-23, 2001.

COSTA S, DE NUZZO M, INFANTE FE, BONAVITA B, MARINELLI M, RUBINO A, et al. Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization. **Gynecol Oncol**, 85: 119-24, 2002.

CUZICK, J. INTERNATIONAL PAPILOMAVIRUS CONFERENCE, 09, 2001, Costão do Santinho, Florianópolis

DE RODA-HUSMAN A.M.; WALBOOMERS J.M.M.; VAN DEN BRULE A.J.C.; MEIJER C.J.L.M.; SNIJDERS P.J.F.. The use of general "primers" GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol**, 76:1057-62, 1995.

DEBARGE H.V., COLLINET P., VINATIER D., EGO A., DEWILDE A., BOMAN F, et al.. Value of human papillomavirus testing after conization by loop electrosurgical excision for high-grade squamous intraepithelial lesions **Gynecologic Oncology**, 90: 587-592, 2003.

DOCUMENTO DE CONSENSO - LA INFECCIÓN POR PAPILOMAVIRUS. Disponível em <http://www.aepcc.org/congreso/pdf/CONS-VPH.pdf> . Acesso em 26 Janeiro. 2004

FORSMO S, BUHAUG H, SKJELDESTAD FE, HAUGEN OA. Treatment of pre-invasive conditions during opportunistic screening and its effectiveness on cervical cancer incidence in one Norwegian county. **Int J Cancer**, 71: 4-8, 1997

GURGEL MS, BEDONE AJ, ANDRADE LA, PANETTA K. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix: histological findings on cone specimens related to residual neoplasia on hysterectomy. **Gynecol Oncol**, 65(3): 437-40, 1997.

HELT AM, FUNK JO, GALLOWAY DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **J Virol**, 76: 10559-68, 2002.

HERRERO R.; HILDESHEIM A.; BRATTI C.; SHERMAN M.E.; HUTCHINSON M.; MORALES J.et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J Natl Cancer Inst**, 92:464-74, 2000.

IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Disponível em: <http://www.iarc.fr>. Acesso em: 22 Outubro. 2002

JAIN S, TSENG CJ, HORNG SG, SOONG YK, PAO CC. Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. **Gynecol Oncol**, 82: 177-80, 2001.

JOHNSON N, KHALILI M, HIRSCHOWITZ L, RALLI F, PORTER R. Predicting residual disease after excision of cervical dysplasia. **BJOG**, 110: 952-5, 2003.

KARLSEN F., KALANTARI M., CHITEMERERE M., JOHANSSON B., HAGMAR B. Modification of Human and Viral Deoxyribonucleic Acid by Formaldehyde Fixation. **Lab Invest**, 71(4): 604-11, 1994.

KJAER S.K.; VAN DEN BRULE A.J.; BOCK J.E.; POLL P.A.; ENGHOLM G.; SHERMAN M.E.et al. Human papillomavirus: the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer**, 65:601-6, 1996.

KOUTSKY L.A.; HOLMES K.K.; CRITCHLOW C.W.; STEVENS C.E.; PAAVONEN J.; BECKMANN A.M.et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **N Engl J Med**, 327:1272-8, 1992.

LORINCZ AT, CASTLE PE, SHERMAN ME, SCOTT DR, GLASS AG, WACHOLDER S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. **Lancet**, 360: 228-9, 2002.

MELNIKOW J, NUOVO J, WILLAN AR, CHAN BK, HOWELL LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. **Obstet Gynecol**, 92: 727-35, 1998.

MUNOZ N.; BOSCH F.X.; DE SANJOSE S.; VILADIU P.; TORMO J.; MOREO P. et al. Human Papillomavirus in the etiology of cervico-uterine cancer. **Bol Oficina Sanit Panam**, 115:301-9, 1993;.

NEGRI G, GAMPENRIEDER J, VIGL EE, HAITEL A, MENIA E, MIAN C. Human papilloma virus typing at large loop excision of the transformation zone of the cervix uteri. **Anticancer Res**, 23: 4289-92, 2003.

NCBI-NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. .
Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 26 Janeiro. 2004.

NOBBENHUIS M.A.; WALBOOMERS J.M.; HELMERHORST T.J.; ROZENDAAL L.; REMMINK A.J.; RISSE E.K. et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. **Lancet**, 354:20-5, 1999.

OSTOR AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol**, 12: 186-92, 1993.

PARK RB, ANDROPHY EJ. Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. **J Virol**, 76: 11359-64, 2002.

ROLON P.A.; SMITH J.S.; MUNOZ N.; KLUG S.J.; HERRERO R.; BOSCH X. et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. **Int J Cancer** , 85:486-91, 2000

SCHIFFMAN M.; HERRERO R.; HILDESHEIM A.; SHERMAN M.E.; BRATTI M.; WACHOLDER S. et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk provinc of Costa Rica. **JAMA**, 283:87-93, 2000.

SCHIFFMAN M.H.; BAUER H.M.; HOOVER R.N.; GLASS A.G.; CADELL D.M.; RUSH B.B. et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, 85:958-64, 1993.

SCHLECHT N.F.; KULAGA S.; ROBITAILLE J.; FERREIRA S.; SANTOS M.; MIYAMURA R.A.; et al. . Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, 286(24):3106-14, 2001

SCULLY R.E.; BONFIGLIO T.A.; KURMAN R.J.; SILVERBERG S.G.; WILKINSON E.J. et al. **International Histological Classification of Tumors Histological Typing of Female Genital Tract Tumours. World Health Organization (WHO)**. 2^a ed. Berlin, Springer-Verlag, 1994: 39-42

SOLOMON D.; SCHIFFMAN M.; TARONE R.. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: aaseline results from a randomized trial. **J Natl Cancer Inst**, 93: 293-299, 2001.

SYRJANEN KJ. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 65: 45-53, 1996.

VASSALLO J., PINTO G. A., ANDRADE L. A. L. A. PAPILOMAVÍRUS. *In*: ALVES V. A. F., BACCHI C. E., VASSALLO J. **Manual de Imuno-histoquímica**. Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo, 1999, cap. 19, p. 208-215.

VASSALLO J., DERCHAIN S. M., PINTO G. A., SYRJANEN S., ANDRADE L. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Intern J Gynecol Obst**, 71(1): 45-48, 2000.

WALLIN K.L.; WIKLUND F.; ANGSTROM T.; BERGMAN F.; STENDAHL U.; WADELL G. et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. **N Engl J Med**, 341:1633-8, 1999.

ZIELINSKI D.G.; SNIJDERS P.J.; ROZENDAAL L.; VOORHORST F.J.; RUNSINK A.P.; DE SCHIPPER F.A. et al. High-risk HPV testing in women with borderline and mild dyskaryosis: long-term follow-up data and clinical relevance. **J Pathol**, 195:300-6, 2001