

PRISCILA GARCIA FIGUEIREDO

**Redução da Expressão da Ciclo-Oxigenase-2 em
Lesões Precursoras do Câncer do Colo Uterino
em Mulheres com Vaginose Bacteriana**

Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

**UNICAMP
2006**

PRISCILA GARCIA FIGUEIREDO

**Redução da Expressão da Ciclo-Oxigenase-2 em
Lesões Precursoras do Câncer do Colo Uterino
em Mulheres com Vaginose Bacteriana**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

**UNICAMP
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F469r Figueiredo, Priscila Garcia
 Redução da expressão da Ciclo-Oxigenase-2 em
 lesões precursoras do câncer do colo uterino em
 mulheres com vaginose bacteriana / Priscila Garcia
 Figueiredo. Campinas, SP: [s.n.], 2006.

 Orientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain
 Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Vaginose Bacteriana. 2. Inflamação. 3.
 Papilomavirus Humano. I. Derchain, Sophie Françoise
 Mauricette. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: PRISCILA GARCIA FIGUEIREDO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 21/08/2006

Dedico este trabalho...

*... ao meu pai, Octacílio,
pelo exemplo de dedicação à Medicina,
sem nunca abdicar do convívio familiar,
que com muito amor e humildade
me ensinou os valores da vida.*

*à minha mãe Dirce,
por seu amor infinito,
presença fundamental em todas as horas,
amiga e grande incentivadora de novas conquistas.*

*ao meu querido esposo Paulo,
pelo significado em minha vida.
Sem seu dedicado amor, cumplicidade e incentivo,
nada seria conquistado.*

*... ao meu filho Felipe,
minha maior razão de sempre seguir em frente.*

*... aos meus irmãos Octacílio e Eduardo,
pelo carinho e apoio.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica; pela competência, disponibilidade e, sobretudo, pela amizade que cultivamos durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian, pela amizade, solicitude e pelo auxílio ímpar na elaboração deste estudo.

À Dra. Júlia Kawamura Tambascia, agradeço pelo incentivo e pela rica participação no diagnóstico microbiológico e citológico das lâminas de Papanicolaou.

À Dra. Adriana Yoshida Olimpio, pelo auxílio na coloração e na leitura dos exames de imuno-histoquímica.

À Profa. Dra. Salete Costa Gurgel, pelas valiosas observações desta tese, enriquecendo-a de forma a sempre valorizar as linhas de pesquisa.

Ao Dr. André de Almeida Schenka, por ter proporcionado tão rico conhecimento, contribuindo com importantes sugestões para o aperfeiçoamento desta tese.

À Dra. Renata Clementino Gontijo, pelas sugestões na finalização deste trabalho.

À Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos pela contribuição e participação no diagnóstico microbiológico das lâminas.

À pós-graduanda Michelle Garcia Discacciati pela contribuição muito especial no delineamento deste estudo, e pela oportunidade de aprendizagem das técnicas de leitura dos exames a fresco e de Papanicolaou.

Ao Prof. Dr. José Antônio Simões, pelo rico conhecimento e incentivo à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gustavo Antônio de Souza, pela oportunidade de aprendizagem e pelo suporte da área de Oncologia Ginecológica do CAISM.

Às biólogas Denise Pita Lima, Elizabete Campos e Lúcia Carvalho, pelo processamento dos exames da Captura Híbrida II.

À toda equipe do Ambulatório de Patologia Cervical do CAISM, pela convivência agradável e pela ajuda em viabilizar o atendimento das pacientes.

À Sra. Margarete Donadon, pela amizade e pela contribuição muito especial nos aspectos burocráticos para a realização desta dissertação.

À Sra. Maria do Rosário G. R. Zullo e à ASTEC, pela revisão dos aspectos formais desta tese.

À Neuza Balducci, Sônia Pianca, Débora Fernandez e Pryscilla Rosa, da secretaria da área de oncologia, pela total disponibilidade.

Às MULHERES, que confiam em nós.

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos números 00/06394-0 e 04/09309-5 e Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 307252/2004-3

A coleta de dados foi realizada no Ambulatório de Patologia Cervical do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Unicamp

O estudo teve a participação dos Departamentos de Tocoginecologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp; dos Laboratórios de Citopatologia, Clínico Especializado e de Patologia Experimental do CAISM

Estrutura da Tese

Esta tese é apresentada no formato alternativo de teses de doutorado da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e de acordo com o disposto em “Normas, procedimentos e orientações para publicações de dissertações e teses da Faculdade de Ciências Médicas (2005)”.

Esta tese faz parte de uma linha de pesquisa iniciada em 2000 que avalia vários fatores envolvidos na carcinogênese e evolução da neoplasia intra-epitelial cervical. Inclui uma introdução ao tema, os objetivos do projeto de pesquisa, e um artigo original encaminhado para publicação no periódico *Sexually Transmitted Diseases*. Os métodos e os resultados obtidos estão apresentados no artigo. Em seguida, a tese apresenta uma conclusão e as referências bibliográficas. Nos anexos foram incluídos: o termo de consentimento livre e esclarecido utilizado para o atendimento das mulheres; os pareceres do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) dos projetos, números 264/2000 e 309/2004 que originaram os resultados aqui apresentados, a listagem das pacientes incluídas no estudo e um mini-curriculum da candidata referente às suas atividades durante a pós-graduação.

A coleta de dados foi realizada no ambulatório de Patologia Cervical do CAISM/Unicamp, nos Laboratórios de Citopatologia, Laboratório Clínico Especializado e laboratório de Patologia Experimental do CAISM/Unicamp coordenados pelo Departamento de Tocoginecologia Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Unicamp e pelo Departamento de Anatomia Patológica da FCM/Unicamp.

Sumário

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. PUBLICAÇÃO	31
4. CONCLUSÕES.....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
6. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES	67
7. ANEXOS	68
7.1. ANEXO 1 – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	68
7.2. ANEXO 2 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	70
7.3. ANEXO 3 – LISTAGEM DAS PACIENTES	74
7.4. ANEXO 4 – MINI-CURRÍCULO DA CANDIDATA DESDE O SEU INGRESSO NA PÓS- GRADUAÇÃO ..	80

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AGC	<i>Atypical glandular cells</i> ; Atipia em células glandulares
ASC	<i>Atypical squamous cells</i> ; Atipia em células escamosas
BV	<i>Bacterial vaginosis</i>
°C	Graus Celsius; <i>Celsius degrees</i>
CAF	Cirurgia de alta frequência
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHII	Captura Híbrida II
CI	Intervalo de confiança; <i>Confidence interval</i>
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-2	Ciclo-oxigenase-2; <i>Cyclooxygenase-2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico; <i>deoxyribonucleic acid</i>
et al.	E outro(s); e outra(s)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HCII	<i>Hybrid Capture II</i>
HE	Hematoxilina e Eosina; <i>Hematoxylin and eosin</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana; <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	Papilomavírus humano; <i>Human papillomavirus</i>

H2O2	Água oxigenada; <i>Hydrogen peroxide</i>
HSIL	Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau; <i>High-grade squamous intraepithelial lesion</i>
i.e.	Ou seja; <i>that is</i>
IHC	Imunohistochemistry
Ig	Imunoglobulina; <i>immunoglobulin</i>
IL	Interleucina; <i>interleukin</i>
KOH	Hidróxido de potássio
LSIL	Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau; <i>Low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
PC	Controle positivo; <i>Positive control</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Prostaglandina; <i>prostaglandin</i>
Pg/mcl	Picograma por microlitro; <i>Picogram per mililiter</i>
PMNL	Leucócitos polimorfonucleares; <i>Polymorphonuclear leukocytes</i>
RLU	Unidade relativa de luz; <i>Relative Light Unit</i>
SIL	Lesão escamosa intra-epitelial; <i>Squamous intraepithelial lesion</i>
TXA	Tromboxano; <i>Tromboxane</i>
TNF	Fator de necrose tumoral; <i>tumor necrosis factor</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
USA	Estados Unidos da América; <i>United States of América</i>
VB	Vaginose bacteriana

Resumo

Introdução: a vaginose bacteriana (VB) representa uma condição clínica caracterizada pela substituição da flora vaginal normal por bactérias predominantemente anaeróbias ou facultativas. Paralelamente, estudos têm demonstrado que a expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima marcadora de inflamação, encontra-se alterada em processos neoplásicos. **Objetivo:** avaliar a relação entre a expressão da COX-2 e a presença de VB em mulheres portadoras de lesões escamosas intra-epiteliais cervicais. **Sujeitos e métodos:** para este estudo de corte transversal, foram selecionadas 228 mulheres portadoras de anormalidades citológicas compatíveis com lesões induzidas pelo Papilomavirus humano (HPV), no período de Fevereiro de 2001 a Abril de 2004. A VB foi diagnosticada através da presença de pelo menos 20% de *clue cells* no esfregaço de Papanicolaou. A detecção do HPV de alto risco oncogênico, foi realizada através do exame de Captura Híbrida II (CH II), sendo estas amostras colhidas antes da realização da biópsia ou da conização. O diagnóstico histológico foi compatível com colo normal ou cervicite em 11 casos (5%), neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) grau 1 (NIC 1) em 35 (15 %), NIC 2 em 31 (14%) e NIC 3 em 151 casos (66%). A expressão citoplasmática da COX-2 foi

determinada por imuno-histoquímica e avaliada no espécime de tecido que apresentava a lesão mais grave. **Resultados:** a VB foi diagnosticada em 38 (17%) das 228 mulheres. O HPV de alto risco oncogênico foi detectado em 192 (84%) mulheres. O diagnóstico de VB foi significativamente maior em mulheres com infecção pelo HPV ($p=0,05$). A distribuição da VB foi similar entre os diferentes graus histológicos da NIC ($p=0,42$). A presença de VB foi significativamente menor em mulheres com expressão moderada ou forte da COX-2 ($p=0,02$; OR=0,4 IC 95% 0,2 a 0,9). Quando se relacionou a detecção do HPV com a expressão da COX-2, observou-se uma proporção significativamente maior de mulheres infectadas pelo HPV com expressão moderada ou forte da COX-2 ($p=0,04$). A expressão da COX-2 não esteve significativamente associada à gravidade da NIC ($p=0,24$). **Conclusões:** a VB esteve associada com a presença de infecção pelo HPV e com a menor expressão da COX-2. A expressão da COX-2 foi maior em mulheres infectadas pelo HPV, embora não tenha havido associação entre a expressão da COX-2 e a gravidade da NIC.

Summary

Background: bacterial vaginosis (BV) is a syndrome characterized by a reduction in the normal *Lactobacillus* microflora and an excessive growth of microorganisms such as anaerobes and facultative. In parallel, studies suggest that COX-2 expression, an enzyme related to inflammatory response, is altered due to neoplastic processes. **Objectives:** to assess the relation between COX-2 expression and BV in women with cervical squamous intraepithelial lesions. **Subjects and methods:** a cross-sectional study enrolled 228 women due to cytological abnormalities in Papanicolaou smears, through February 2001 to April 2004. The finding of 20% or more *clue cells* on Papanicolaou smears was considered positive for the presence of BV. High-risk HPV detection was assessed through Hybrid Capture II (HCII). Collection of samples for Papanicolaou smears and for HCII was performed immediately before biopsy or conization. Pathological diagnoses were classified as normal/cervicitis in 11 cases (5%), cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade 1 (CIN 1) in 35 (15 %), CIN 2 in 31 (14%) and CIN 3 in 151 (66%). Cytoplasmic expression of COX-2, evaluated from the tissue block that harbored the most significant lesion, was ascertained through immunohistochemistry. **Results:** BV was rendered as

positive in 38 (17%) of 228 women. High-risk HPV detection was present in 192 (84%) women. The diagnosis of BV was significantly higher in women with HPV infection ($p=0.05$). The prevalence of BV was similar across different grade of CIN ($p=0.42$). Presence of BV was significantly lower among women with moderate and strong expression of COX-2 ($p=0.02$; OR=0.4 IC95% 0.2 to 0.9). When analyzing HPV detection according to the COX-2 expression, a significantly higher proportion of women infected by high-risk HPV showed a moderate and strong expression of COX-2 ($p=0.04$). COX-2 expression was not associated with the severity of CIN ($p=0.24$). **Conclusions:** the presence of BV was related to HPV infection and negative or weak COX-2 expression. COX-2 expression was higher in HPV infected women, although no difference was observed in relation to the severity of CIN.

1. Introdução

A flora vaginal normal é composta predominantemente por espécies de *Lactobacillus*, os quais exercem uma importante influência no ecossistema da vagina. Sabe-se que a produção de substâncias inibidoras por algumas espécies de *Lactobacillus*, tais como os ácidos orgânicos, as bacteriocinas e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), suprime o crescimento de bactérias patogênicas endógenas, mantendo o equilíbrio vaginal normal. Sob condições ainda desconhecidas, os *Lactobacillus* podem ser suprimidos e a condição clínica denominada vaginose bacteriana (VB), manifestar-se (Aroutcheva et al., 2001a). A VB é a causa mais freqüente de corrimento vaginal em mulheres na idade reprodutiva, podendo ocorrer em 9% a 38% das mulheres atendidas em clínicas ginecológicas (Davis et al., 1997; Lamont et al., 2000; Yen et al., 2003).

Atualmente, a VB é considerada uma síndrome clínica que envolve o trato genital inferior caracterizada pela substituição da flora lactobacilar normal, por bactérias anaeróbias ou facultativas, como a *Gardnerella vaginalis*, o *Mobiluncus sp* e o *Mycoplasma hominis*, entre outras (Aroutcheva et al., 2001b;

Hellberg et al., 2001). Nesta síndrome, ocorrem mudanças de fatores metabólicos que afetam o equilíbrio microbiológico. A glicose, proveniente do glicogênio vaginal, deixa de ser degradada em ácido láctico pelos lactobacilos produtores de H_2O_2 e passa a ser transformada em ácidos graxos pelas bactérias anaeróbias. Estes ácidos graxos aumentarão o pH vaginal a níveis superiores a 4,5, criando um ambiente desfavorável ao crescimento dos lactobacilos e favorável ao crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, fechando um ciclo que favorece a VB (Eschenbach et al., 1989). Paralelamente às alterações microbiológicas, mudanças bioquímicas tais como, o aumento do pH vaginal (Amsel et al., 1983), a produção de aminas voláteis (Chen et al., 1982), de sialidase bacteriana (Cauci et al., 1998), de endotoxinas (Sjoberg e Hakansson, 1991) e de citocinas (Zariffard et al., 2005) também ocorrem nesta síndrome.

São incomuns os sintomas inflamatórios e irritativos das paredes vaginais na VB, devido à ausência de leucócitos polimorfonucleares. Isto se deve à inibição da quimiotaxia que ocorre nesta síndrome, ou seja, a presença do ácido succínico e ácido acético que são produtos finais do metabolismo de bactérias anaeróbias, inibem a migração de leucócitos polimorfonucleares e monócitos (Thomason et al., 1991; Winefield e Murphy, 1998; Al-Mushrif et al., 2000).

A degradação de aminoácidos através de mecanismos enzimáticos e da presença de microorganismos, leva à formação de diferentes compostos, entre eles as aminas biogênicas ou poliaminas. Por exemplo, a descarboxilação da lisina e da ornitina produz a cadaverina e a putrescina, respectivamente, assim como a histamina é produzida a partir da degradação da histidina. Níveis elevados

de aminas biogênicas como a putrescina, a cadaverina e a timetilamina, também podem ser encontradas nas secreções vaginais de mulheres que apresentam certas condições patológicas (Wolrath et al., 2001).

Estudos preliminares têm demonstrado que existe uma forte correlação entre os altos níveis de aminas biogênicas presentes na VB, na tricomoníase e na candidíase vaginal (Chaim et al., 2003). Wolrath et al. (2001) encontram a presença de putrescina, cadaverina e tiramina em altas concentrações na secreção vaginal de 24 mulheres com VB. Estas mesmas aminas estiveram ausentes ou presentes em concentrações muito baixas na secreção vaginal em mulheres sem VB, sugerindo uma forte correlação entre VB e estas aminas no conteúdo vaginal.

A síntese de poliaminas induz a proliferação e diferenciação celular e, seus níveis aumentados podem ser encontrados no plasma e na urina de indivíduos com câncer. Já está bem estabelecido o papel das poliaminas na carcinogênese do cólon. Sabe-se que as aminas estão aumentadas em 3 a 4 vezes nos tecidos comprometidos quando comparadas ao tecido intestinal normal (Milovic e Turchanowa, 2003).

O diagnóstico de VB ainda é um desafio e merece algumas considerações. Na prática clínica, o diagnóstico da VB é feito, em geral, por meio do método de Amsel et al. (1983). Por este método, para o diagnóstico de VB é necessária a presença de pelo menos três dos seguintes critérios: presença de corrimento vaginal homogêneo, leitoso e branco-acinzentado; liberação de um odor fétido similar a “peixe em decomposição” decorrente das aminas voláteis, ao se

adicionar gotas de KOH a 10% a uma fração do conteúdo vaginal, chamado teste de “whiff”; pH vaginal > 4,5 e; a identificação de células epiteliais recobertas por bactérias no exame microscópico a fresco do conteúdo vaginal, as quais são chamadas *clue cells* ou células indicadoras.

O diagnóstico laboratorial da VB foi inicialmente descrito por Spiegel et al. (1983) que padronizaram o diagnóstico bacterioscópico em amostras vaginais coradas pelo método de Gram. Nugent et al. (1991) simplificaram o método de Spiegel, e esta classificação é hoje aceita como padrão-ouro para o diagnóstico de VB. Por meio da coloração de esfregaços pelo método de Gram são identificados e quantificados os morfotipos bacterianos classificados como; morfotipos de *Lactobacillus* (Bacilos Gram positivos); morfotipos de *Gardnerella vaginalis* e *Bacteroides sp* (cocobacilos gram-negativos ou gram-variáveis) e; morfotipos de *Mobiluncus spp* (bacilos curvos gram-negativos). Cada morfotipo é quantificado e graduado em uma escala de pontuação de 0 a 10, na qual um valor igual ou maior a 7 é considerado positivo para VB (Quadro 1).

Quadro 1. Critério de Nugent para o diagnóstico de vaginose bacteriana

A. Bacilos longos Gram (+)			
B. Cocobacilos gram (-) ou gram-variáveis			
C. Bacilos curvos gram-negativos			
Escore para cada um dos morfotipos			
Zero= sem morfotipos no campo de imersão (1000x)			
1+= menos que um morfotipo por campo de imersão (1000x)			
2+= um a quatro morfotipos por campo de imersão (1000x)			
3+= cinco a trinta morfotipos por campo de imersão (1000x)			
4+= mais que trinta morfotipos por campo de imersão (1000x)			
A+B+C	0 a 3	4-6	>7
	Normal	Intermediária	Vaginose

Outro método laboratorial utilizado para o diagnóstico de VB, apesar de não ser um método bacterioscópico, é o esfregaço de Papanicolaou. Os citopatologistas comumente relatam a presença de *clue cells* nos esfregaços corados por este método, baseando-se na observação de células escamosas, recobertas por bactérias que assumem assim, uma coloração violeta (Gompel e Koss, 1997) (Figura1).

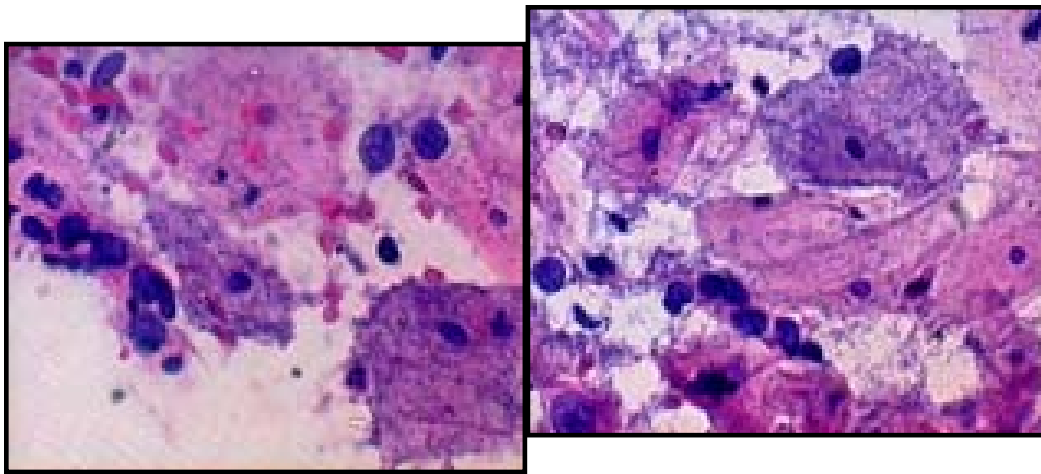


Figura 1: *clue cells* representadas em esfregaços de Papanicolaou.

Os critérios para o diagnóstico de VB em esfregaços cervicovaginais corados pelo método de Papanicolaou variam entre os estudos. Schnadig et al. (1989) classificaram a flora bacteriana pelo método de Papanicolaou resumidamente como: padrão lactobacilar; padrão anaeróbio com ou sem bacilos curvos e; padrão escasso. Em outro estudo, utilizou-se apenas a identificação de *clue cells* para

o diagnóstico de VB, entretanto sem nenhuma forma de quantificação (Platz-Christensen et al., 1989). O Sistema de Bethesda 2001 traz como critérios para o diagnóstico de VB, a presença de um fundo de lâmina constituído por uma fina camada de cocobacilos; presença de *clue cells* e notável ausência de lactobacilos utilizando o termo “modificação da flora vaginal compatível com VB” (Solomon et al., 2002).

Existem controvérsias em relação ao uso do exame citopatológico de Papanicolaou para o diagnóstico de VB, pois estudos demonstram uma sensibilidade que varia de 66% a 90% e uma especificidade de 86% a 98% (Platz-Christensen et al., 1989; Castro-Sobrinho e Bambirra, 1992; Giacomini et al., 1998; Lamont et al., 1999; Avilés et al., 2001). A falta de um critério único e objetivo para o diagnóstico de VB pode determinar uma variabilidade interobservador e tornar o exame de Papanicolaou um método pouco reprodutivo para este diagnóstico (Giacomini et al., 1998).

Discacciati et al. (2006) com o objetivo de validar o método de Papanicolaou para o diagnóstico de VB utilizaram como critério a presença de 20% ou mais *clue cells* em 20 campos contendo pelo menos 10 células examinadas no aumento de 40x. Todas as lâminas foram avaliadas por dois observadores. Neste estudo, foram incluídas 135 mulheres atendidas no Ambulatório de Planejamento Familiar da Unicamp as quais foram submetidas à coleta de amostras cervicais e vaginais para o exame de Papanicolaou, e também amostras do fundo de saco vaginal para a realização do exame bacterioscópico corado pelo método de Gram e para o exame a fresco. Consideraram como

padrão-ouro, a presença de pelo menos 20% de *clue cells* nos esfregaços, que apresentou uma sensibilidade de 87%, especificidade de 94%, um valor preditivo positivo de 81% e um valor preditivo negativo de 96% na identificação de VB. O método resultou em uma excelente concordância entre amostras cervicais e vaginais (kappa 0,92) e também em uma excelente concordância entre os dois observadores (kappa 0,87).

Estudos têm demonstrado que mulheres portadoras de VB apresentam uma maior incidência de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), devido à associação do HPV ao potencial oncogênico das amins produzidas pela flora bacteriana anormal. Observou-se um aumento significativo dos níveis das poliaminas em indivíduos com câncer de ovário, de mama e de colo uterino (Chanda e Ganguly, 1995). Recentemente, Kim et al. (2005) observaram num estudo envolvendo 104 mulheres com carcinoma de colo estágio IB e IIA que as mulheres com comprometimento linfonodal apresentam níveis de poliaminas significativamente superiores quando comparadas às mulheres sem comprometimento linfonodal.

O Papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico é o principal responsável pelo desenvolvimento da NIC e do câncer do colo do útero. A integração dos genes virais E6 e E7 é responsável pela indução e manutenção das alterações fenotípicas das células malignas, particularmente por alterarem o ciclo celular e os mecanismos de apoptose. A união do gene E6 com o produto do gene supressor de tumor p53 e a união do gene E7 com o produto de gene supressor de tumor pRB, resultam em degradação dos mecanismos de

apoptose, assim como na interferência do controle do ciclo celular (Snijders et al., 2006). Contudo, nem todos os indivíduos infectados pelo vírus desenvolverão a NIC, indicando a participação de fatores adicionais na gênese da lesão (Boyle & Smith, 1999). Estima-se que o risco de infecção pelo HPV durante toda a vida seja de 80%, e que pelo menos 80% das infecções pelo HPV sejam transitórias, não levando ao desenvolvimento da NIC. Entretanto, 22% das mulheres com NIC 2 podem evoluir para NIC 3, e 5% daquelas com NIC 3 podem evoluir para câncer do colo do útero (Östor, 1993). Por outro lado, a persistência do HPV de alto risco oncogênico tem papel fundamental tanto no desenvolvimento da NIC quanto na sua persistência após tratamento (Figueiredo et al., 2003; Sarian et al., 2005; Gontijo et al., 2006; Brummer et al., 2006).

Não existe consenso quanto à associação entre VB, infecção por HPV e carcinogênese cervical. Uthayakumar et al. (1998) observaram num estudo retrospectivo que a presença de anormalidades citológicas foi significativamente maior em mulheres portadoras de condiloma e VB. Castle et al. (2001) mostraram que alterações cervicais secundárias à VB estão associadas à NIC de alto grau em mulheres infectadas por HPV de alto risco oncogênico. Mao et al. (2002), demonstraram uma relação temporal entre a infecção pelo HPV e VB, geralmente o HPV precedendo a VB. Watts et al. (2005) observaram que a presença de VB aumenta o risco de aquisição ou reativação do HPV, já que as alterações no ecossistema vaginal decorrente da VB apresentam papel importante na susceptibilidade da infecção pelo HPV. Em contrapartida, Peters

et al. (1995) não encontraram nenhuma associação entre a presença de vaginose bacteriana e a NIC. Da mesma forma, Mc Nicol et al. (1999), demonstraram que a expressão *in vitro* dos genes E6 e E7 do HPV tipo 16 esteve inalterada mesmo na presença de VB.

Por outro lado, as citocinas são mediadores de imunidade celular que controlam a inflamação e a resposta do hospedeiro à infecção. A flora vaginal anormal com predomínio de bactérias anaeróbias e escassez de lactobacilos está associada com níveis elevados da citocina, interleucina (IL) beta (IL-1 β) (Hedges et al., 2006; Cauci et al., 2003). Gestantes portadoras de VB apresentam elevação dos níveis vaginais de IL-1 β (Imseis et al., 1997) assim como de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , a IL-1 α e a IL-8, que também foram descritas em mulheres portadoras de VB não grávidas (Spandorfer et al., 2001; Yudin et al., 2003).

Os processos inflamatórios consistem em uma resposta fisiológica ao tecido lesado causado por fatores infecciosos ou não, resultando na produção inespecífica de substâncias, que podem causar o câncer através dos danos oxidativos ao DNA da célula-hospedeira (Delves e Roitt, 2000). A associação do processo inflamatório com diversos tipos de câncer sugere que a inflamação seja um fator de risco universal para a carcinogênese. Na década de 70, foi identificada uma enzima catalisadora responsável pela biosíntese da prostaglandina (PG) H₂ a partir do ácido araquidônico, chamada ciclo-oxigenase (COX). Observou-se também que outras enzimas e mecanismos não-enzimáticos transformam a PGH₂ em outras prostaglandinas como a PGE₂,

PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂, e tromboxane (TXA₂), concluindo assim toda a cascata do ácido araquidônico. Inicialmente, foi identificada uma isoforma constitucional da COX em basicamente todos os tipos celulares, que se expressa em níveis constantes nos diversos tecidos. A COX tem importante papel na homeostase tecidual e atua na produção de prostaglandinas citoprotetoras no estômago e intestino para a manutenção da integridade de seus epitélios, na manutenção do fluxo sanguíneo de rins comprometidos, e na agregação plaquetária (Vane et al., 1998).

Em 1990, foi descrita uma segunda isoforma, denominada COX-2. A COX-2, ao contrário da primeira isoforma (COX-1), é induzida por algum estímulo, e seus níveis oscilam em curtos espaços de tempo. Os principais fatores que induzem a COX-2 são aqueles associados com a inflamação, como os lipossacárides bacterianos, as citocinas e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Otto & Smith, 1995; Herschman, 1996).

A produção de prostaglandinas através da indução da COX-2 é freqüentemente envolvida nas doenças inflamatórias, caracterizadas por edema e dano tecidual devido à liberação de citocinas inflamatórias, leucotrienos e fosfolipases (Kuwano et al., 2004). Além de ser induzida por lesões inflamatórias, a COX-2 também pode ser encontrada constitucionalmente no sistema nervoso central, onde desempenha papel importante na dor e febre (Otto & Smith, 1995; Herschman, 1996).

Numerosas citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-2 (IL-2), os hormônios, os fatores de crescimento e os estímulos químicos têm elevado a expressão da COX-2 em diferentes tipos de tecidos, incluindo células malignas, células estromais, epiteliais e não-epiteliais. Foi relatada uma associação da COX-2 com câncer, já que as prostaglandinas sintetizadas a partir da COX-2 estimulam a proliferação de células cancerosas, promovem a angiogênese, inibem a apoptose e elevam o potencial metastático (Tsujii et al., 1998).

Recentemente, alguns estudos demonstraram a maior expressão da COX-2 em tumores de mama, cólon, reto, estômago, cabeça e pescoço, pulmão e colo uterino (Lim et al., 2000; Ryu et al., 2000; Shamma et al., 2000; Kulkarni et al., 2001). Suspeitaram da participação da COX-2 na carcinogênese após observar que, indivíduos que utilizavam inibidores da COX para tratamento de condições inflamatórias crônicas, apresentavam reduções de 40% a 50% no risco para o desenvolvimento de carcinoma colorretal (DuBois et al., 1996) e, em menor intensidade, também para câncer de próstata e mama (Norrish et al., 1998).

Alguns estudos apontam uma associação entre a COX-2 e o carcinoma invasor do colo uterino. Similarmente ao que foi descrito em outros tumores, a expressão aumentada da COX-2 está associada com um risco aumentado de metástase linfonodal e sobrevida reduzida (Kim et al., 2003). Observou-se ainda que a expressão da COX-2 estava significativamente associada ao comprometimento linfonodal e parametrial em pacientes com câncer do colo uterino estágio IB tratadas cirurgicamente (Ryu et al., 2000).

O comportamento da expressão da COX-2 em lesões precursoras do câncer do colo do útero ainda não foi totalmente estabelecido, com dados ainda escassos na literatura. Num estudo que avaliou a expressão da COX-2 nos diferentes graus histológicos da NIC e seu impacto da recidiva de doença em 62 mulheres tratadas com conização diatérmica, observou-se que a COX-2 estava presente em 50% dos casos de NIC 1, 46% dos casos de NIC 2 e em 64% dos casos de NIC 3. A presença da COX-2 nas margens cirúrgicas da conização esteve significativamente associada a um maior risco de persistência ou recidiva da lesão (Farley et al., 2004).

Entretanto, num estudo de corte transversal realizado na nossa instituição não houve associação entre a expressão da COX-2 e gravidade da NIC. Ao estudar 223 mulheres com diagnóstico histológico de cervicite, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e carcinoma escamoso invasor, observou-se que a COX-2 foi expressa em 33% dos espécimes com cervicite, 39% daqueles com NIC 1, 50% daqueles com NIC 2, 58% com NIC 3 e 57% dos casos invasores, sendo esta progressão não significativa. Ao avaliar a correlação da expressão da COX-2 com a detecção do HPV, observou-se que a expressão da COX-2 foi semelhante em mulheres com e sem HPV, embora a proporção de mulheres com HPV tivesse sido muito elevada. Os autores concluíram que a expressão da COX-2 é elevada em lesões cervicais escamosas, independentemente da sua gravidade (Sarian et al., 2006).

Embora amplamente estudada, ainda não se conhece os fatores que levam à progressão das lesões cervicais escamosas HPV-induzidas. Os efeitos

da VB como co-fator no surgimento de lesões escamosas cervicais ainda não estão muito bem estabelecidos. Alguns autores sugerem que a VB parece contribuir como facilitador da integração do genoma do HPV às células da zona de transformação do colo do útero. Paralelamente, a COX-2, um marcador específico de inflamação associado à carcinogênese de vários tecidos inclusive do colo do útero, parece manter a mesma taxa de expressão nos diferentes graus de NIC. Assim, torna-se necessário avaliar o papel da VB em mulheres com NIC e sua relação com a expressão da COX-2 e a infecção por HPV.

2. Objetivos

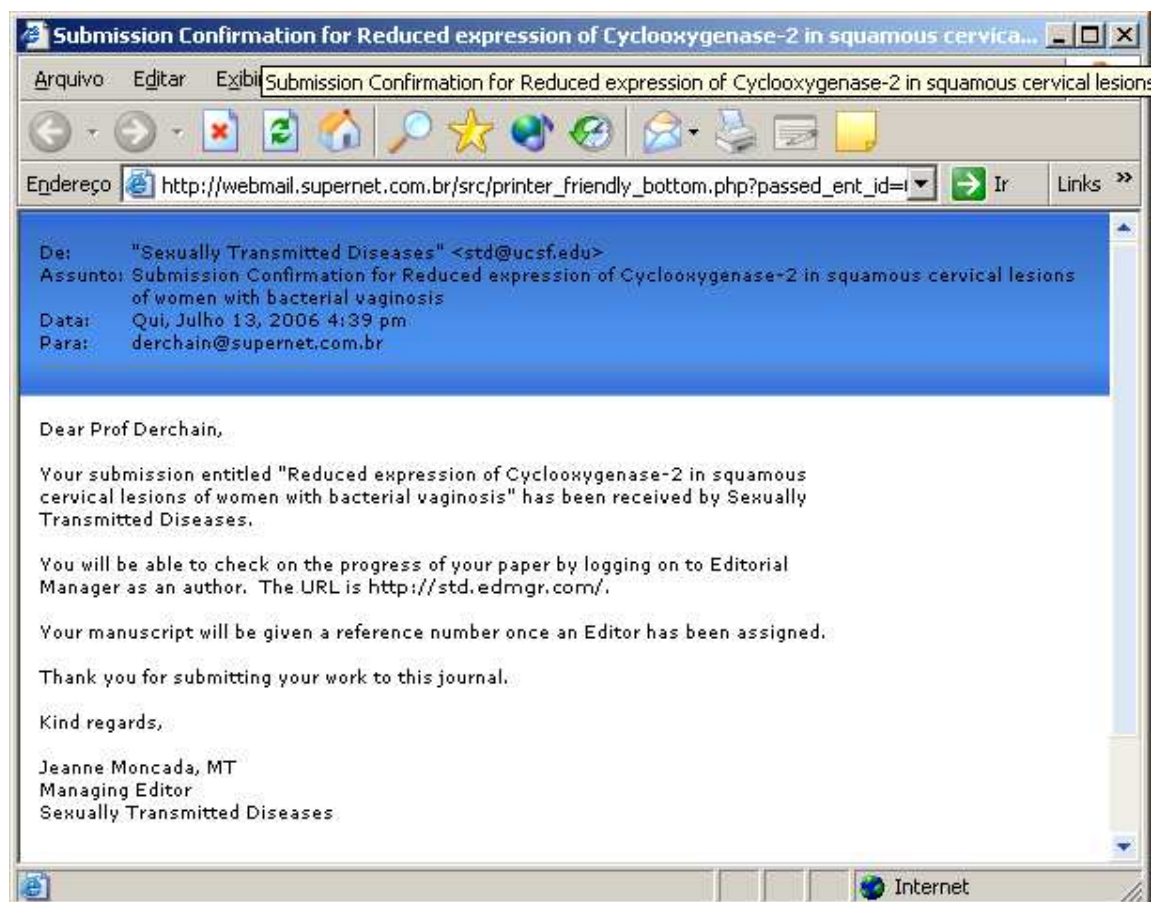
2.1. Objetivo geral

Avaliar a relação entre a expressão da COX-2 e a presença de VB em mulheres portadoras de lesões escamosas intra-epiteliais cervicais.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de VB em mulheres com lesões cervicais HPV-induzidas e sua relação com a detecção do HPV de alto risco oncogênico e a gravidade histológica da NIC.
- Avaliar a relação entre a expressão da COX-2 com a presença de VB, detecção do HPV de alto risco oncogênico e com a gravidade histológica da NIC.

3. Publicação



Reduced expression of Cyclooxygenase-2 in squamous cervical lesions of women with bacterial vaginosis

Priscila Garcia Figueiredo, MD

Julia Kawamura Tambascia, MD

Luis Otávio Zanatta Sarian, MD, PhD

Adriana Yoshida, MD

José Antônio Simões, MD, PhD

Silvia Helena Rabelo dos Santos, PhD

Michelle Garcia Discacciati de Carvalho, Biologist

Sophie Françoise Mauricette Derchain, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil

Corresponding author.

Sophie F. M. Derchain

Rua Antônio Hossri, 629 – Cidade Universitária

13083-370 – Campinas – SP.

Fone: +55-19-37889305 / Fax: + 55-19-3289 5935

E-mail: derchain@fcm.com.br

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, cancer, inflammation, immunohistochemistry

Artigo submetido para publicação no periódico *Sexually Transmitted Diseases*

Abstract

Objective: to assess the effects of Bacterial Vaginosis (BV) on the expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in squamous lesions of the uterine cervix.

Materials and Methods: the study sample is made up of 228 women, treated for cervical squamous abnormalities in a referral Cervical Pathology Center. Collection of cervical samples for Pap smears and for Hybrid Capture II (HCII) (*Digene Diagnostics Inc., USA*) was carried out immediately before performing biopsy or conization through loop electrosurgical excision procedure. Pathological diagnoses were rendered according to the World Health Organization criteria's and classified as normal/cervicitis (11 cases) (5%), CIN 1 (35 cases) (15 %), CIN 2 (31 cases) (14%) and CIN 3 (151 cases) (66%). COX-2 immunoreactivity grading was based on the German ImmunoReactive score. The diagnosis of BV in the Papanicolaou smear was based on the observation of at least 20% of *clue cells* in 20 fields (40x) with least 10 epithelial cells. The smear was considered positive for BV when at least two *clue cells* were found per field. **Results:** the prevalence of BV was similar across histological strata ($p=0.42$). There was a negative association between the expression of COX-2 in cervical tissues and presence of BV (OR = 0.4; 95%CI 0.2 to 0.9). Twelve percent of women with moderate and strong expression of COX-2 had BV, whereas 22% of those with negative and weak expression of the marker shared the diagnosis of BV. HPV infection was associated in a borderline manner to COX-2 expression ($p=0.04$; OR=2.3 95%CI 1.0 to 5.4). Expression of COX-2 did not differ with regards to disease severity ($p=0.24$). **Conclusions:** there was a negative relation between the expression of COX-2 in squamous cervical lesions and BV.

Introduction

Developing countries are still challenged to reduce the mortality related to cancer of the uterine cervix. The disease persists as the second leading cause of cancer deaths among women worldwide, most notably in their reproductive years [1]. Because cervical cancer is preventable and curable, especially during its pre-invasive phase, and has its etiology firmly correlated with human papillomavirus (HPV) infection [2], efforts to improve the screening and treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) have been fruitful. Despite the elevated prevalence of HPV infection, only a few infected women will go on to develop cervical cancer. This suggests that environmental or host factors are involved in malignant progression, including local immunological status [3], smoking [4] and history of sexually transmitted infections [5]. A carcinogenetic role has been ascribed to inflammatory processes in the development of CIN [6].

Bacterial vaginosis (BV) is a common abnormality of the female genital tract, characterized by a shift of the bacterial flora from normal to predominantly anaerobic bacteria [7]. The bacterial flora that constitutes BV is variable but usually consists of *Gardnerella vaginalis* and gram-negative anaerobes, such as *Prevotella*, *Bacteroides*, *Mobiluncus* and *Peptostreptococcus* species [8]. Approximately 50% of women with BV are asymptomatic [8], and the chief complaint of patients who do have symptoms is a malodorous vaginal discharge. BV is associated with a number of obstetric and gynecological complications, including preterm labor, chorioamnionitis and pelvic inflammatory disease [9,10].

It has been suggested that BV may be important for the development of squamous intraepithelial lesions (SIL), since abnormal microflora can produce carcinogenic nitrosamines [5] and stimulate the release of some cytokines [11]. Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β and IL-8 are proinflammatory cytokines that have been found to be elevated in cervical discharge of both pregnant and non-pregnant women with BV [12,13,14]. In recent studies, BV tended to be more common among women with high-grade SIL (HSIL) than in women with no cytological abnormalities [15,16]. On the other hand, some authors have found no correlation between BV and SIL [17,18].

There is substantial evidence that shifts in vaginal flora may affect cervical tissues, facilitating the incorporation of HPV oncogenes into the genome of cells of the transformation zone [19]. The cervical milieu, when cervical pathology is present, has been shown to be highly inflamed [20]. It is still unknown, however, whether inflammatory processes are directly associated with the development of CIN. Inflammation can be assessed in human tissues by determining the expression of enzymes linked to metabolism of prostaglandins (PG). Cyclooxygenase is a key enzyme in production of prostaglandins from arachidonic acid (AA), and one of its isoforms, COX-1, is constitutively expressed in normal cells and is involved in physiological mechanisms. COX-2 is normally involved in pathways of pain and inflammation, frequently undetectable in most tissues, but can be rapidly induced by various factors, such as hormones and growth factors [21,22]. It has been suggested that COX-2 might induce tumor proliferation and spread by enhancing mitogenesis, reducing

cellular adhesion and immune surveillance [23,24]. In a previous study, we found that expression of COX-2 is abundant in epithelial cervical lesions, but not related to disease severity nor to HPV infection [25].

Proper investigational attention should be focused on the possible relations between BV and expression of COX-2, because both entities have been shown to affect (or be affected by) the carcinogenesis in HPV-infected cervical tissues. This was therefore the motivation for the development of the present study, which is an attempt to shed further insight into the expression of COX-2 as related to the presence of BV in women with squamous cervical abnormalities.

Materials and methods

Women selection and examination routine

A series of 228 women, treated at the Colposcopy Clinic of Medical School Hospital of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, due to cytological abnormalities in referral Pap smears, was selected for this cross-sectional study. All women were subjected to an interview, addressing clinical and socio-demographic concerns, and shortly afterwards to a thorough pelvic examination, including colposcopy. Collection of new cervical samples for Pap smears and for Hybrid Capture II (HCII) (*Digene Diagnostics Inc., USA*) was performed immediately before performing biopsy or electrosurgical conization. Enrollment was carried out between February 2001 and April 2004. The study

protocol was approved by the local Ethics Committee. All enrolled women gave their agreement to participate by signing the Informed Consent.

Hybrid Capture II

The specimen for HCII were tested for probe B (high-risk HPVs: types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) [26], and the test was classified as positive when the relative light unit ratio [RLU of specimen/mean RLU of two positive controls (PC)-HC index] was 1 pg/ml or greater. This RLU/PC ratio provided an estimate of the amount of HPV-DNA in the specimens, i.e., the viral load in the sample. The storage of the specimens and all reagents as well as conduction of the tests took place at Campinas Medical School Hospital Laboratory (Unicamp), following the manufacturer's instructions (*Digene Diagnostics Inc., USA*). HCII was positive in 192 cases (84%) and negative in 36 (16%).

Histology

When possible, biopsy and treatment of cervical lesions were accomplished with the same procedure, i.e. diathermic conization. Histological samples were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (HE). Pathological diagnoses were rendered according to the World Health Organization criteria's [27] and classified as normal/cervicitis (11 cases) (5%), CIN 1 (35 cases) (15 %), CIN 2 (31 cases) (14%) and CIN 3 (151cases) (66%).

Cytological diagnosis

Cervical smears were collected immediately before conization, fixed in alcohol and sent to the Cithopathology Laboratory (Unicamp), where they were stained according to the Papanicolaou technique. Cytopathological evaluation was carried out according to routine laboratory procedures, using the 2001 Bethesda System Terminology [28].

Diagnostic procedures for bacterial vaginosis

The diagnosis of BV in the Papanicolaou smear was described in a recently and accurate study, with excellent reproducibility [29], eliminating the need for additional collection of vaginal samples, based on the observation of at least 20% of clue cells as follows: 20 representative fields containing at least 10 epithelial cells were randomly selected and examined under 40 x magnification. The smear was considered positive for BV when at least two clue cells were found per field (Figure 1A and 1B). All smears were examined by the same cytopathologist. Diagnosis of bacterial vaginosis was rendered as positive in 38 (17%) women and negative in 190 (83%).

Immunohistochemistry (IHC) and assessment of IHC slides

Analysis of all slides was performed by one investigator blinded to the patient's clinical parameters. Digitalized photographs of high power fields (400x) were taken from hot-spots of reaction with a Nikon COOLPIX Camera 995, and

then images were ported to a Personal-Computer based software for histological analyses (Imagelab 2000).

COX-2 protein expression

COX-2 immunoreactivity grading was based on the German ImmunoReactive score [30]. Firstly, staining intensity in the cytoplasm was rated on a scale from 0 to 3, with 0 being no staining at all, 1 weak staining, 2 moderate and 3 strong staining. Then, positive and negative cells were counted, with no less than 500 cells as the minimum acceptable count number. The percentage of positive cells was then scored as: no staining as 0; 1-10% as 1; 11 to 50% as 2; 51 to 80% as 3 and 81% to 100% as 4. The final score was calculated by multiplying the score obtained with the staining intensity by that derived from the percentage of positive cells, achieving theoretical results ranging 0 to 12. A final score of 0 was regarded as negative, 1-4 as weak, 5-8 as moderate and 9 to 12 was considered as strong immunoreactivity. COX-2 protein expression was negative in 34 (15%) histological specimens, whereas 69 (30%) lesions presented with weak expression, 50 (22%) with moderate and 75 (33%) with strong expression of the antigen. For statistical purposes, two groups were formed: negative and weak immunoreactivity (103 women – 45%); moderate and strong immunoreactivity (125 women – 55%) (Figure 1C and 1D).

Statistical analysis

Data were recorded in Open Office® spreadsheet files. All statistical calculations were performed with the R *Environment* [31] statistical software

package, set to 95% confidence intervals (95%CI). Univariate analysis with chi-squares and the Fisher's exact test were accomplished to test eventual relations between the presence of BV and COX-2 expression, HPV detection, cytological and histological results. A regression model has also been fit to rule out inter-relation between these variables, and adjusted p values were calculated this manner. The same procedure was adopted to test the relations between expression of COX-2 and the variables mentioned above.

Results

BV was diagnosed more frequently among women infected by HPV ($p=0.05$). Nevertheless, the proportion of women with HPV infection was high in those either diagnosed with (95%) or without (82%) BV. The prevalence of BV was similar across histological strata ($p=0.42$) (Table 1).

There was a negative association between the expression of COX-2 in cervical tissues and presence of BV (OR = 0.4; 95%CI 0.2 to 0.9). Twelve percent of women with moderate and strong expression of COX-2 had BV, whereas 22% of those with negative and weak expression of the marker shared the diagnosis of BV. HPV infection was associated in a borderline manner ($p=0.04$; OR=2.3 95%CI 1.0 to 5.4), being that 87% of the women with moderate and strong COX-2 expression were infected by the virus, as contrasted to 81% of the women with negative and weak expression of the enzyme. Expression of COX-2 did not differ with regards to disease severity ($p=0.24$) (Table 2).

Discussion

The reduced expression of COX-2 in cervical squamous lesions of women with BV is compatible with the idea that the condition may affect, directly or not, the mechanisms related to the inflammatory responses in the cervical milieu. BV has traditionally been considered a noninflammatory condition, and it has been well established that inflammatory conditions predispose cervical tissues to HPV infection. However, at variance with the current concepts concerning BV, there are reports demonstrating a decrease in proinflammatory cytokine levels, most notably IL-1 β and TNF- α , after treatment of bacterial vaginosis [12,13, 32, 33]. The persistence of interleukin-1 β in women who failed therapy might be related to the persistence of bacterial endotoxin in vaginal milieu [12], which suggests that BV, if not itself a cause of inflammation, affects the inflammatory responses in the vaginal environment. These findings, however, contrast to the present results in those previous reports demonstrated that BV enhance proinflammatory mediators, whereas in the current series the expression of COX-2 – an enzyme related to inflammation - was reduced in specimens of women harboring BV.

Mucosal immune system activation, especially innate immunity, represents a critical response against microorganisms colonizing the reproductive tract that could prevent severe complications associated with abnormal vaginal flora [34,35,36]. Neutrophil recruitment and activation is considered the main innate immune response against microbial and viral infections of the vaginal mucosa [37]. BV-associated alterations of vaginal

mucosal system are partially understood. However, it is not known why most women with BV show no inflammatory signs, whereas other vaginal infections such as trichomoniasis, candidiasis, cause major inflammatory symptoms and leukocyte accumulation. Interleukin (IL)-8 is a potent chemotatic and activating factor for neutrophils that has been detected in vaginal fluid of women with BV and other vaginal infections [14, 38]. IL-8 is a pleiotropic cytokine with several functions; it is produced by many different kinds of cells including neutrophils, monocytes, macrophages, endothelial and epithelial cells in response to different stimuli. IL-8 has many roles in the reproductive tract [39, 40]. Several innate factors such as IL-1, neutrophils and matrix metalloproteinase-9 stimulate production or enhance activity of IL-8 [41, 42]. A recent study showed that impairment of IL-8 induction in women with BV is associated with low levels of vaginal immunoglobulin (Ig)A against haemolysin produced by *Gardnerella vaginalis*, a low number of leukocytes, and high microbial hydrolytic enzyme activities [35]. It is thus sensible to speculate that a reduced inflammatory activity mediated by IL-8 and other cytokines may be the culprit of the reduced expression of COX-2 in cervical lesions taken from women with BV.

Many aspects of vaginal innate immunity are still to be disclosed. BV is the most prevalent vaginal disorder in non-pregnant and pregnant women [8,43]. It is associated with several adverse outcomes, including increased susceptibility to human immunodeficiency virus (HIV) infection [44], upper genital tract infections [45], endometritis [46], post-surgical infections [47], urinary tract infections [48], and adverse pregnancy outcomes [49,50]. BV is

accompanied, or characterized by, a decreased lactobacilli flora and a largely increased colonization of several facultative and strictly anaerobic microorganisms [51]. A study involving groups of healthy women and BV positive non-pregnant women showed that BV causes a dramatic increase of IL-1 β (20-fold) concentrations and decrease of IL-8 concentrations [32]. This shows that the innate immune system is reacting strongly and trying to fight abnormal microbial colonization, although most BV positive women do not show any inflammatory sign. In fact neutrophils and IL-8 are not increased in BV positive women. In that same study, the authors suggest that BV produces virulence factors that specifically inhibit IL-8 more than IL-1 β . And the resulting IL-8 low levels may be responsible for the low counts of vaginal leukocytes and for clinically observed absence of inflammatory symptoms in most women with BV. Restitution of normal cytokines levels is dependent upon controlling BV [12].

The results of previous studies on the impact that BV has on development of cervical dysplasia have been conflicting. A study was performed to establish possible relations between BV and CIN [52]. Presence of clue cells on Papanicolaou smears was their method of diagnosing BV, which has been reproduced in the present study. In that series, the relative risk of having CIN 3 was 5.0 if the subject had BV, but the study was severely flawed by the fact that subjects were not tested for HPV infection. Previous reports have focused on epidemiological factors that might be related to genital infections, and it has been shown that self-reported abnormal vaginal discharge was related to CIN 1 in HPV-infected women [53].

Studies of vaginal flora in women with HPV-induced abnormalities in cytological smears have demonstrated higher percentages (23.6%) of *Gardnerella vaginalis*, when compared to cytological smears without HPV-induced abnormalities [54]. In a study controlled for HPV, no correlation was found between BV and CIN [18]. Recently, another study described that women with bacterial vaginosis were not found to have CIN more frequently than women with normal vaginal flora and the quantities of nitrosamines produced by women with BV did not differ significantly from women without BV [17]. In their series, the prevalence of BV was 9.8% in smears suggestive of HPV-induced squamous lesions, compared to 17% of BV in women harboring Low or high SIL smears in the present series. Overall, there is a large bulk of evidence favoring the plausibility of a relation between cervical inflammation and the risk for cervical cancer in HPV-infected women, but the knowledge on the relations between BV and CIN remains blurred.

The behavior of COX-2 in pre-invasive cervical lesions is still under investigation, and its expression has been suggested to increase in parallel to the grade of CIN and possibly to have a potential role in predicting CIN recurrence after conservative treatments [55]. In contrast, a recent study found that COX-2 expression is abundant in epithelial cervical lesions, but COX-2 detection was not related to disease severity and HPV detection rates did not differ significantly across COX-2 expression [25]. There is a potential influence of other cervical infections, not investigated in the present series, which may justify the lack of association between BV and COX-2 expression, as well as

with the other variables under scrutiny. For instance, it is well known that infections by *Chlamydia trachomatis*, *Candida sp* and other infectious agents are prevailing conditions in Brazilian women living in underprivileged economic conditions. These concurrent infections might have offset an eventual association between BV and the inflammatory response in the HPV-induced cervical lesions. The authors acknowledge that, at this point, it would be virtually impossible to retrieve information on other types of infection with the samples available. BV frequently coexists with cervicitis, and this association has long been shown to occur in up to 50% of the cases [56]. Therefore, the present results, which point towards a negative relation between BV and the inflammatory response in CIN, might be contested through a more comprehensive evaluation of the infectious processes occurring at the moment that the conservative treatments (i.e., cervical conization) are performed. However, it should be emphasized that BV has never been firmly implicated as a stand-alone infectious process involved in the formation of CIN, and the present series, although lacking confirmation of other genital infectious, corroborates the assumption that BV is much likely to play only a marginal role in the pathogenesis of squamous abnormalities of the uterine cervix.

Table 1– Bacterial Vaginosis (BV) as related to HPV detection and histological diagnosis

Variables		Bacterial Vaginosis (BV)			p	Adjusted** p
		Total	Negative	Positive		
HPV						
Negative	36	34 (18%)	2 (5%)	0.05	0.05	
Positive	192	156 (82%)	36 (95%)			
Histology						
Cervicitis	11	11 (6%)	0	0.58*	0.42	
CIN 1	35	29 (15%)	6 (16%)			
CIN 2	31	26 (14%)	5 (13%)			
CIN 3	151	124 (65%)	27 (71%)			

*Chi-square for trend in proportions.

**Adjusted p: based on the coefficients derived from linear regression including all variables in this table as co-factors for BV.

Table 2 – COX-2 expression as related to BV, HPV detection and histological diagnosis

Variables	Total	COX-2 Expression		P	OR (95%CI)**
		Negative/weak	Moderate/strong		
BV					
Absent	190	80 (78%)	110 (88%)		Ref
Present	38	23 (22%)	15 (12%)	0.02	0.4 (0.2 to 0.9)
HPV detection					
Negative	36	20 (19%)	16 (13%)		Ref
Positive	192	83 (81%)	109 (87%)	0.04	2.3 (1.0 to 5.4)
Histology					
Cervicitis	11	4 (4%)	7 (6%)		Ref
CIN 1	35	14 (14%)	21 (17%)		1.0 (0.2 to 4.2)
CIN 2	31	18 (17%)	13 (10%)		0.4 (0.1 to 1.1)
CIN 3	151	67 (65%)	84 (67%)	0.24*	0.6 (0.3 to 1.4)

*Chi-square for trend in proportions.

**Adjusted Odds Ratio: based on the coefficients derived from linear regression including all variables in this table as co-factors for COX-2 expression.

Acknowledgements

To Denise Pitta, Elizabete Campos and Lucia Fagian for technical assistance in HPV detection. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processes numbers 00/06394-0 and 04/09309-5 and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number 307252/2004-3.

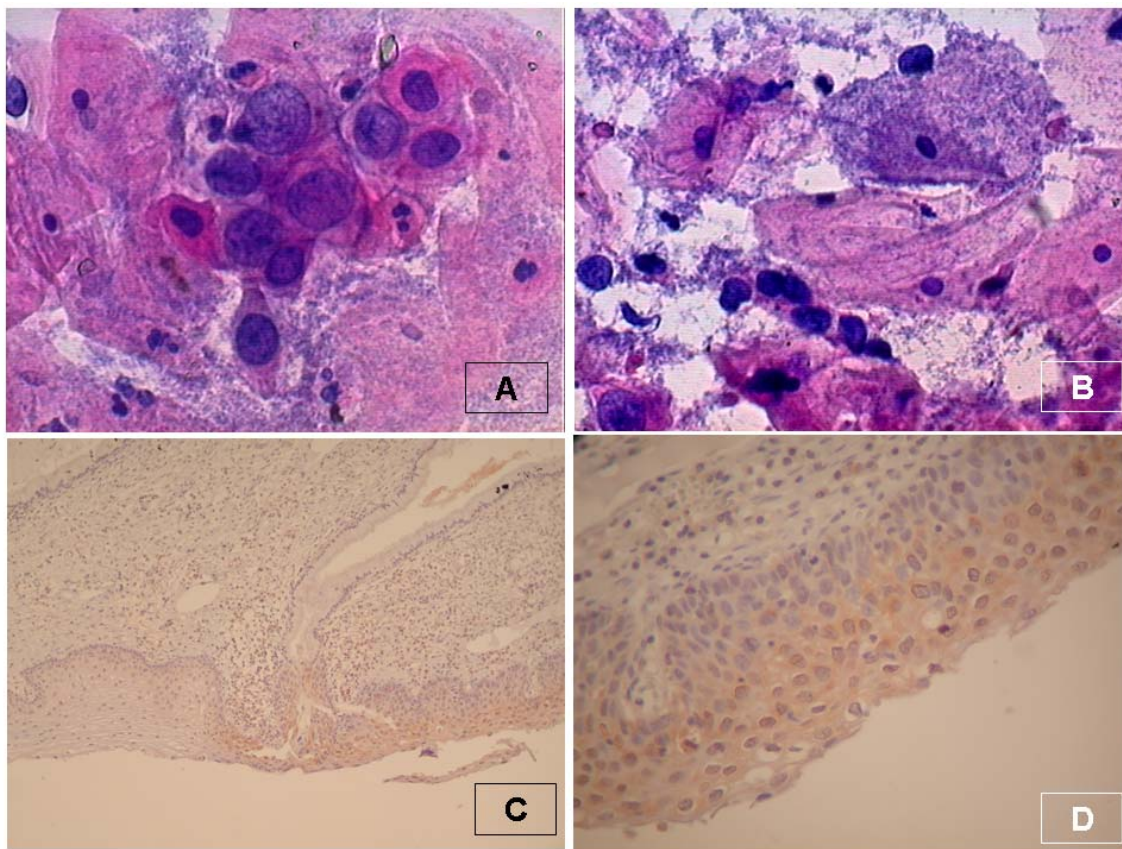


Figure 1 – Cytology and histology slides in a selected CIN 3 case

A and B: Cytological aspects of high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) cells surrounded by clue cells

C: Low-power microphotograph representative of the transition from normal cervical epithelium to CIN 3. Cytoplasm is stained for COX-2.

D: Low-power microphotograph displaying details of the abnormal cervical epithelium, with prominent (moderate/strong) COX-2 expression.

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *Ca Cancer J Clin.* 2005; 55:74-108.
2. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-27.
3. Al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 1998; 184:283-90.
4. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer.* 1992; 69:2276-82.
5. Pavic N. Is there a local production of nitrosamines by the vaginal microflora in anaerobic vaginosis/trichomoniasis? *Med Hypotheses.* 1984; 15:433-6.
6. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003; 31:29-34.
7. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis.* 1999; 180:1950-6.
8. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169:455-9.
9. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, et al. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol.* 2001; 97:211-9.

10. Genc MR, Witkin SS, Delaney ML, et al. A disproportionate increase in IL-1 β over IL-1 α in the cervicovaginal secretions of pregnant women with altered vaginal microflora correlates with preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:1191-7.
11. Behbakht K, Friedman J, Heimler I, et al. Role of the vaginal microbiological ecosystem and cytokine profile in the promotion of cervical dysplasia: a case-control study. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2002; 10:181-6.
12. Yudin MH, Landers DV, Meyn L, et al. Clinical and cervical cytokine response to treatment with oral or vaginal metronidazole for bacterial vaginosis during pregnancy: a randomized trial. *Obstet Gynecol.* 2003; 102:527-34.
13. Spandorfer SD, Neuer A, Giraldo PC, et al. Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. *J Reprod Med.* 2001; 46:806-10.
14. Wennerholm UB, Holm B, Mattsby-Baltzer I, et al. Interleukin-1 α , interleukin-6 and interleukin-8 in cervico/vaginal secretion for screening of preterm birth in twin gestation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998; 77:508-14.
15. Discacciati MG, Simões JA, Lopes ES, et al. Is bacterial vaginosis associated with squamous intraepithelial lesion of the uterine cervix? *Diagn Cytopathol.* 2006; 34:323-5.
16. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:1021-7.

17. Boyle DC, Barton SE, Uthayakumar S, et al. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int J Gynecol Cancer*. 2003; 13:159-63.
18. Peters N, Van Leeuwen AM, Pieters WJ, et al. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. *Sex Transm Dis*. 1995; 22:296-302.
19. Brabin L, Fairbrother E, Mandal D, et al. Biological and hormonal markers of chlamydia, human papillomavirus, and bacterial vaginosis among adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2005; 81:128-32.
20. Schwebke JR, Weiss HL. Ref 20 Interrelationships of bacterial vaginosis and cervical inflammation. *Sex Transm Dis*. 2002; 29:59-64.
21. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998; 38:97-120.
22. Hayes EC, Rock JA. COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstet Gynecol Surv*. 2002; 57:768-80.
23. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 1999; 18(55):7908-16.
24. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996; 271:33157-60.
25. Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol*. In Press 2006.

26. Nindl I, Lörincz A, Mielzynska I, et al. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol.* 1998; 10:49-56.
27. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, et al. *Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization – International Histological Classification of Tumors.* Berlin, GE: Springer-Verlag; 1994.
28. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287:2114-9.
29. Discacciati MG, Simões JA, Amaral RG, et al. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. *Diagn Cytopathol.* 2006; 34:272-6.
30. Remmele W, Schickelanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract.* 1993; 8:227-45.
31. R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-00-3, Available at: <http://www.R-project.org>.
32. Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:53-8.

33. Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2000; 182:467-73.
34. Cauci S, Driussi S, Monte R, et al. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178:511-515.
35. Cauci S, Guaschino S, Driussi S, et al. Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2002a; 185:1614-20.
36. Donders GG, Bosmans E, Dekeersmaecker A, et al. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182:872-8.
37. Milligan GN, Bourne N, Dudley KL. Role of polymorphonuclear leukocytes in resolution of HSV-2 infection of the mouse vagina. *J Reprod Immunol.* 2001; 49:49-65.
38. Filler SG, Pfunder AS, Spellberg BJ, et al. *Candida albicans* stimulates cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression by endothelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64:2609-17.
39. Khatun S, Kanayama N, Belayet H, et al. Interleukin-8 potentiates the effect of interleukin-1-induced uterine contractions. *Hum Reprod.* 1999; 14:560-5.
40. Sennstrom MB, Ekman G, Westergren-Thorsson G, et al. Human cervical ripening, an inflammatory process mediated by cytokines. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:375-81.

41. Denison FC, Riley SC, Elliott CL, et al. The effect of mifepristone administration on leukocyte populations, matrix metalloproteinases and inflammatory mediators in the first trimester cervix. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:541-8.
42. Elliott CL, Allport VC, Loudon JA, et al. Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:787-90.
43. Cauci S, Driussi S, De Santo D, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol.* 2002b; 40:2147-52.
44. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet.* 1997; 350:546-50.
45. Sweet RL. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2000; 8:184-90.
46. Ness RB, Soper DE, Holley RL, et al. Douching and endometritis: results from the PID evaluation and clinical health (PEACH) study. *Sex Transm Dis.* 2001; 28:240-5.
47. Guaschino S, De Santo D, De Seta F. New perspectives in antibiotic prophylaxis for obstetric and gynaecological surgery. *J Hosp Infect.* 2002; 50:13-6.
48. Hillebrand L, Harmanli OH, Whiteman V, et al. Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186:916-7.

49. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333:1737-42.
50. McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 2000; 55:1-19.
51. Eschenbach DA. History and review of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1993; 169:441-5.
52. Platz-Christensen JJ, Sundstrom E, Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1994; 73: 586-8.
53. Greenberg MD, Reid R, Schiffman M, et al. A prospective study of biopsy-confirmed cervical intraepithelial neoplasia grade 1: colposcopic, cytological, virological risk factors for progression. *J Lower Genit Tract Dis*. 1999; 3:104-110.
54. Murta EF, Souza MA, Araújo Junior E, et al. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* and Human papillomavirus virus in cytological smears. *Sao Paulo Med J*. 2000; 118:105-8.
55. Farley J, Uyehara C, Hashiro C, et al. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. *Gynecol Oncol*. 2004; 92:596-602.
56. Moi H. Prevalence of bacterial vaginosis and its association with genital infections, inflammation and contraceptive methods in women attending sexually transmitted diseases and primary health clinics. *Int J STD AIDS*. 1990; 1:86-94.

4. Conclusões

- A prevalência de VB em mulheres com lesões cervicais HPV-induzidas foi de 17%. A presença de VB foi significativamente maior em mulheres com HPV de alto risco oncogênico, porém não se associou com a gravidade histológica da NIC.
- A expressão da COX-2 foi significativamente menor em mulheres com VB, embora tenha sido observada uma associação com a infecção pelo HPV. A gravidade histológica da NIC não esteve associada à expressão da COX-2.

5. Referências Bibliográficas

Al-Mushrif S, Eley A, Jones BM. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. **J Med Microbiol** 2000; 49:1023-30.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial epidemiologic associations. **Am J Med** 1983; 74:14-22.

Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. **Am J Obstet Gynecol** 2001a; 185:375-9.

Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. **Clin Infect Dis** 2001b; 33:1022-1027.

Avilés AG, Zaragoza CO, Barrera LT, Vasquez RM, Rosas RP. Es útil la tinción de Papanicolaou como auxiliar del diagnóstico de algunas infecciones de transmisión sexual? **Atención Primaria** 2001; 27:222-6.

Boyle DCM, Smith, JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Gynecol Cancer** 1999; 9:177-86.

Brummer O, Hollwitz B, Bohmer G, Kuhnle H, Petry KU. Human papillomavirus-type persistence patterns predict the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol** 2006; in press.

Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti, MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:1021-7.

Castro-Sobrinho JM e Bambirra EA. Contribuição para o estudo etiológico das vaginoses bacterianas. **Rev Bras Anal Clin** 1992; 24:31-4.

Cauci, S, Driussi, R, Monte, Lanzafame P, Pitzus E, Quadrifoglio F. Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. **Am J Obstet Gynecol** 1998; 178:511-515.

Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. **Mol Hum Reprod** 2003; 9:53-8.

Chaim W, Karpas Z, Lorber A. New technology for diagnosis of bacterial vaginosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2003; 111:83-7.

Chanda R, Ganguly AK. Diamine-oxidase activity and tissue di-and poly-amine contents of human ovarian, cervical and endometrial carcinoma. **Cancer Lett** 1995; 89:23-8.

Chen KCS, Amsel R, Eschenbach DA, Holmes, KK. Biochemical diagnosis of vaginitis: determination of diamines in vaginal fluid. **J Infect Dis** 1982; 145:337-345.

- Davis JD, Connor EE, Clark P, Wilkinson EJ, Duff P. Correlation between cervical cytologic results and Gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. **Am J Obstet Gynecol** 1997; 177:532-535.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med** 2000; 343:37-49.
- Discacciati MG, Simões JA, Amaral RG, Brolazo E, Rabelo-Santos SH, Westin MC, et al. Presence of 20% or more clue cells: na accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. **Diagn Cytopathol** 2006; 34:272-6.
- DuBois RN, Radhika, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. **Gastroenterology** 1996; 1259-62.
- Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. **J Clin Microbiol** 1989; 27:251-6.
- Farley J, Uyehara C, Hashiro G, Belnap C, Birrer M, Salminen E. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. **Gynecol Oncol** 2004; 92:596-602.
- Figueiredo PG, Derchain SFM, Sarian LOZ, Gontijo RC, Andrade LALA, Campos EA, et al. Detecção do DNA do Papillomavirus humano após excisão da zona de transformação com alça diatérmica para tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical. **RBGO** 2003; 25:9-15.
- Giacomini G, Calcinai A, Moreti D, Cristofani AR. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. **Sex Trans Dis** 1998; 25:24-7.

Gompel C, Koss LG. Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas. Ed. Manole Ltda. 1997.

Gontijo RC, Derchain SF, Roteli-Martins C, Braganca JF, Sarian LO, Morais SS, et al. Human papillomavirus (HPV) infections as risk factors for cytological and histological abnormalities in baseline PAP smear-negative women followed-up for 2 years in the LAMS study. ***Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol***. In press 2006.

Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. ***J Infect Dis*** 2006; 93:556-62.

Hellberg D, Nilsson S, Mardh PA. The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. ***Arch Gynecol Obstet*** 2001; 265:11-5.

Herschman HR. Prostaglandin endoperoxidase synthase 2. ***Biochim Biophys Acta*** 1996; 1299:125-40.

Imseis HM, Greig PC, Livengood CH 3rd, Shunior E, Durda P, Erikson M. Characterization of the inflammatory cytokines in the vagina during pregnancy and labor and with bacterial vaginosis. ***J Soc Gynecol Investig*** 1997; 4:90-4.

Kim MH, Seo SS, Song YS, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 associated with expression of VEFG in primary cervical cancer and at metastatic lymph nodes. ***Gynecol Oncol*** 2003; 90:83-90.

Kim YT, Yoon BS, Kim JW, Kim SH, Kwon JY, Kim JH. Pretreatment levels of serum squamous cell carcinoma antigen and urine polyamines in women with squamous cell carcinoma of the cervix. ***Int J Gynaecol Obstet*** 2005; 91:47-52.

Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. ***Clin Cancer Res*** 2001; 7:429-34.

Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, et al. Cyclooxygenase-2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. ***FASEB J*** 2004; 18:300-10.

Lamont RF, Hudson EA, Hay PE, Morgan DJ, Modi V, Ison CA, et al. A comparison of the use of Papanicolaou-stained cervical cytological smears with Gram-stained vaginal smears for the diagnosis of bacterial vaginosis in early pregnancy. ***Int J STD AIDS*** 1999;10:93-7.

Lamont RF, Morgan DJ, Wilden SD, Taylor-Robinson D. Prevalence of bacterial in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. ***Int J STD AIDS*** 2000; 11:495-498.

Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. ***Clin Cancer Res*** 2000; 6:519-25.

Mao C, Hughes JP, Kiviat N, Kuypers J, Lee SK, Adam DE, et al. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. ***Am J Obstet Gynecol*** 2003;188:677-84.

McNicol PJ, Paraskevas M, Guijon FB. The effect of vaginal microbes on in vivo and in vitro expression of human papillomavirus 16 E6-E7 genes. ***Cancer Detect Prev*** 1999; 23:13-21.

Milovic V, Turchanowa L. Polyamines and colon cancer. ***Biochem Soc Trans*** 2003; 31:381-3.

Norrish AE, Jackson RT, McRae CU. Non-steroidal and anti-inflammatory drugs and prostate cancer progression. **Int J Cancer** 1998; 77:511-5.

Nugent RP, Khrohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **J Clin Microbiology** 1991; 29:297-301.

Östor AG. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **Int J Gynecol Pathol** 1993; 12:186-92.

Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and 2. **J Lipid Mediat Cell Signal** 1995; 12:139-56.

Peters N, van Leeuvan AM, Peters W. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. **Sex Trans Dis** 1995; 22:296-302.

Platz-Christensen JJ, Larsson PG, Sundstrom E, Bondeson L. Detection of bacterial vaginosis in Papanicolaou smears. **Am J Obstet Gynecol** 1989; 160:132-3.

Ryu HS, Chang KH, Yang, HW, Kim MS, Kwon HC, Oh KS. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. **Gynecol Oncol** 2000; 76:320-5.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, de Angelo Andrade LA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. **Gynecol Oncol**. 2006; in press.

Sarian LO, Derchain SF, Pitta da R, Andrade LA, Morais SS, Figueiredo PG. Human papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent

high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ). **Tumori** 2005; 91:188-92.

Schnadig VJ, Davie KD, Shafer SK, Yandell RB, Islam MZ, Hannigan EV. The cytologist and bacterioses of the vaginal-ectocervical area. Clues, commas and confusion. **Acta Cytol** 1989; 33:287-97.

Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y. Up regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1229-38.

Sjoberg I, Hakansson S. Endotoxin in vaginal fluid of women with bacterial vaginosis. **Obstet Gynecol** 1991; 77:265-266.

Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. **J Pathol** 2006; 208:152-64.

Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA** 2002; 287:2114-9.

Spandorfer SD, Neuer A, Giraldo PC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relationship of abnormal vaginal flora, proinflammatory cytokines and idiopathic infertility in women undergoing IVF. **J Reprod Med** 2001; 46:806-10.

Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. **J Clin Microbiol** 1983; 18:170-7.

Thomason JL, Gelbart SM, Scaglione NJ. Bacterial vaginosis: current review with indications for asymptomatic therapy. **Am J Obstet Gynecol** 1991;165:1210-7.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S. Cyclooxygenase-2 regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 1998; 93:705-16.

Uthayakumar S, Boyle D, Barton S, Nyagam A, Smith J. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia-Cause or Coincidence? **J Obstet Gynecol** 1998; 18:574-6.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 1998; 38:97-120.

Watts DH, Fazzari M, Minkoff H, Hillier SL, Sha B, Glesby M, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1-infected and high-risk HIV-1-uninfected women. **J Infect Dis** 2005; 191:1129-39.

Winefield AD, Murphy SA. Bacterial vaginosis: a review. **Clin Excell Nurse Pract** 1998; 2:212-7.

Wolrath H, Forsum U, Larsson PG, Boren H. Analysis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. **J Clin Microbiol** 2001; 39:4026-31.

Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-experienced young women entering the military. **Am J Obstet Gynecol** 2003; 102:927-33.

Yudin MH, Landers DV, Meyn L, Hillier SL. Clinical and cervical cytokine response to treatment with oral or vaginal metronidazole for bacterial vaginosis during pregnancy: a randomized trial. **Obstet Gynecol** 2003;102:527-34.

Zariffard MR, Novak RM, Lurain N, Sha BE, Graham P, Spear GT. Induction of tumor necrosis factor-alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA

expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. **J Infect Dis** 2005; 191:1913-21.

6. Bibliografia de Normatizações

França JL, Borges SM, Vasconcellos AC, Magalhães MHA. **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^a ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Consentimento Livre e Esclarecido

Detecção do DNA-HPV antes e após a conização com cirurgia de alta frequência (CAF) em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical

Eu, Sra _____, portadora do RG _____, atendida no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) no ambulatório de Patologia Cervical, fui convidada a participar desta pesquisa porque o resultado do meu exame de prevenção mostrou alteração nas células do colo do útero e necessito de tratamento.

Sei que este estudo tem como objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco oncogênico no meu colo uterino antes e após a conização por cirurgia de alta frequência com alça.

Sei que serei submetida a uma entrevista sobre informações pessoais que ficarão de posse da Dra. Priscila Garcia Figueiredo, que manterá o sigilo destas.

Sei também, que serão realizados alguns exames: colposcopia, que é a visualização do colo do útero com uma lente de aumento, um teste para saber se eu tenho ou não o vírus que causa o câncer do colo uterino. Fui informada de que estes exames apresentam risco mínimo de complicações.

O tratamento da lesão do colo do útero será a conização, que é a retirada de um pedaço maior do colo do útero (cone) com anestesia local no próprio ambulatório. Sei que a realização da conização por esta técnica é indolor e que a sua principal complicação é a hemorragia que, porém, não é freqüente.

Sei também que, após a conização, deverei comparecer após quatro meses neste ambulatório, para nova avaliação e novos exames. Nestes retornos, serão realizados: o exame de prevenção, o material para a detecção do HPV, a colposcopia e, uma biópsia do colo do útero somente quando necessário.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e a não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório. Sei também que a qualquer momento posso desistir de participar da pesquisa, sem nenhum dano para a minha saúde e tratamento.

Também fui informada de que não terei custos para participar da pesquisa, pois, o intervalo entre as consultas será o mesmo realizado de rotina no ambulatório.

Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de entrar em contato com a Dra. Priscila Garcia Figueiredo no telefone 3788-9376.

Assinatura da paciente: _____.

Assinatura do pesquisador: _____.

Campinas, _____ de _____ de 200__.

7.2. Anexo 2 – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0__19 7888936
fax 0__19 7888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 28/08/00

PARECER PROJETO: Nº 264/2.000

IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "PERSISTÊNCIA DO DNA-HPV APÓS A CONIZAÇÃO COM CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) EM MULHERES COM NIC2 OU 3."

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Maurillette Derchain

INSTITUIÇÃO: Departamento de Tocoginecologia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 16/08/2000

II - OBJETIVOS

Trata-se de um estudo prospectivo para avaliar a persistência e a carga viral de DNA-HPV em mulheres submetidas a cirurgia para conização do colo uterino e verificar se existe alguma correlação entre a detecção do vírus e a presença de doença residual ou recidiva após a cirurgia.

III - SUMÁRIO

Os pesquisadores pretendem avaliar um total de 168 pacientes, atendidas no ambulatório de Patologia Cervical do CAISM-UNICAMP. Critérios de inclusão serão: mulheres com citologia oncológica alterada (NIC 2 ou NIC3) ou suspeita de carcinoma micro-invasivo e que tenham uma indicação clínica para o procedimento de conização do colo uterino. A técnica utilizada para a cirurgia será a conização por cirurgia de alta frequência (técnica essa já em uso rotineiro no serviço) e para a avaliação da carga viral do HPV será utilizada a técnica da captura de híbridos (técnica essa também já bem estabelecida na literatura). O estudo envolve ainda a coleta de informações através de questionários estruturados.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

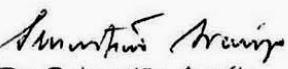
Analisando o projeto sob o aspecto ético, concluímos ser uma pesquisa bem elaborada, com a revisão da literatura, casuística, justificativa, material e métodos são adequados. O termo de consentimento livre e esclarecido está em conformidade com as resoluções CNS 196/96 e 251/97

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

A ser homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP em 12 de setembro de 2.000


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 21/09/04.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 309/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "RECIDIVA DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL APÓS CONIZAÇÃO DIATÉRMICA EM MULHERES COM INFECÇÃO PELO PAILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DA REGULAÇÃO DO CICLO"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Mauricette Derchain

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 28/06/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/09/05

--

II - OBJETIVOS

Avaliar a ocorrência de persistência ou recidiva da neoplasia intra-epitelial após conização diatérmica, em até 36 meses após o tratamento, em mulheres com infecção pelo HPV em função da expressão de proteínas relacionadas ao controle de ciclo celular, da apoptose e da invasividade tumoral e neo-angiogênese. A pesquisa pretende auxiliar no planejamento de medidas propedêuticas e terapêuticas que visem otimizar o seguimento clínico após o tratamento conservador da neoplasia intra-epitelial.

III - SUMÁRIO

Trata-se de uma pesquisa de doutorado na forma de estudo clínico prospectivo envolvendo mulheres atendidas no laboratório de Patologia Cervical do CAISM submetidas à conização diatérmica do colo do útero e com neoplasia intra-epitelial cervical 2 ou 3. as mulheres serão acompanhadas por 36 meses. O tamanho amostral será calculado com base em informações estabelecidas sobre a prevalência de infecção dos HPV tipo 16 18 e outros de alto risco oncogênico. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos e a metodologia da pesquisa está bem detalhada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O protocolo está bem explicado e o TCLE está claro. O material coletado para teste de HPV será coletado em conjunto com aquele para a colpocitologia oncológica, sem desconforto adicional para as mulheres participantes da pesquisa.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de setembro de 2004.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.3.

Anexo 3 – Listagem das pacientes

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
1	753816-1	29	HSIL	NEG	2460,67	NIC 3	2	70	91
2	753831-1	40	HSIL	POS	998,35	NIC 3	2	97	137
3	753830-7	20	LSIL	POS	6,21	NIC 1	2	69	69
4	754603-9	40	INVASOR	NEG	2384,93	NIC 3	3	90	10
6	496839-9	34	HSIL	NEG	670,80	NIC 3	3	100	0
7	754606-1	56	HSIL	POS	388,37	NIC 3	1	43	133
8	510147-7	45	HSIL	NEG	73,55	NIC 3	3	90	10
11	755488-4	21	HSIL	NEG	4,10	NIC 1	3	76	59
14	755593-5	26	HSIL	NEG	5,65	NIC 3	2	100	0
16	150900-3	27	HSIL	NEG	12,25	NIC 3	0	0	1
17	755501-2	47	HSIL	NEG	319,12	NIC 3	3	236	174
18	271509-7	40	HSIL	NEG	1340,73	NIC 3	3	90	10
19	755687-2	31	HSIL	NEG	494,17	NIC 3	2	115	142
21	756597-8	29	HSIL	POS	1026,12	NIC 3	3	127	94
22	756612-4	35	ASC	NEG	312,89	NIC 3	3	145	84
23	561404-0	33	HSIL	NEG	0,15	CERVICITE	2	35	65
24	757396-9	48	HSIL	NEG	87,60	NIC 3	3	80	20
26	758287-9	32	HSIL	POS	136,52	NIC 3	3	90	10
28	758368-9	30	HSIL	NEG	149,69	NIC 3	3	90	10
29	759015-1	42	LSIL	POS	90,10	NIC 1	3	224	109
30	228989-0	41	HSIL	POS	894,73	NIC 1	3	85	15
31	757490-1	32	HSIL	NEG	232,57	NIC 3	1	19	96
32	755416-1	26	LSIL	NEG	57,53	NIC 1	1	15	85
33	758896-6	43	HSIL	NEG	707,12	NIC 3	2	272	107
34	758904-9	33	HSIL	NEG	2292,67	NIC 3	3	80	20
35	469398-2	23	HSIL	NEG	192,34	NIC 1	2	90	10
36	755579-9	38	HSIL	NEG	12,07	NIC 3	3	100	1
37	761348-8	38	HSIL	NEG	315,86	NIC 3	1	30	70
38	759943-2	48	HSIL	NEG	59,67	NIC 3	3	85	15
40	210872-7	34	HSIL	NEG	1,17	NIC 3	2	85	15
42	754045-1	29	HSIL	NEG	25,11	NIC 3	2	75	25
43	723016-9	23	HSIL	POS	0,19	NIC 1	2	132	62
46	76233-8	43	HSIL	NEG	0,21	NIC 2	1	45	55
47	762298-4	29	LSIL	NEG	1026,95	NIC 1	2	65	35
51	762324-9	43	LSIL	NEG	0,16	NIC 1	1	25	75
52	762366-7	37	HSIL	POS	15,39	NIC 3	1	25	75
53	759949-6	31	HSIL	NEG	458,69	NIC 2	0	0	1

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
54	159868-2	36	HSIL	NEG	366,98	NIC 1	1	89	126
56	446448-8	34	ASC	NEG	0,27	NIC 1	0	0	1
57	763146-2	33	HSIL	NEG	165,84	NIC 3	1	20	80
59	763247-2	28	HSIL	NEG	31,40	NIC 3	2	120	90
60	737571-5	23	HSIL	NEG	8,73	NIC 3	3	90	10
61	762289-3	42	LSIL	NEG	0,13	NIC 1	2	65	36
62	763242-2	45	LSIL	NEG	0,21	CERVICITE	1	61	115
63	764027-7	35	INVASOR	NEG	0,38	NIC 3	3	100	0
64	764130-0	37	HSIL	NEG	957,56	NIC 3	1	20	80
65	763650-3	36	HSIL	NEG	287,31	NIC 2	1	15	85
66	764213-8	27	HSIL	NEG	13,94	NIC 2	3	99	92
67	764217-4	31	ASC	NEG	0,15	NIC 1	2	99	21
68	764240-1	26	HSIL	NEG	1395,37	NIC 3	1	15	85
69	764251-0	50	HSIL	POS	7,93	NIC 3	3	101	103
70	88503-2	49	HSIL	NEG	633,58	NIC 3	1	40	60
72	763723-6	36	INVASOR	POS	334,24	NIC 3	1	15	85
73	765081-0	49	HSIL	NEG	0,19	NIC 1	3	47	33
74	765009-2	33	HSIL	POS	154,85	NIC 3	3	100	0
75	764991-2	36	INFL.	NEG	1,60	NIC 3	3	290	197
76	765166-6	29	HSIL	NEG	594,48	NIC 2	2	90	61
77	765167-0	37	HSIL	NEG	6,06	NIC 3	2	40	60
78	765175-7	31	INFL.	NEG	0,19	NIC 1	2	30	70
79	765187-0	27	HSIL	NEG	11,28	NIC 3	1	60	165
80	743243-0	29	HSIL	NEG	0,41	NIC 3	2	114	179
81	766686-3	28	HSIL	POS	363,02	NIC 3	1	40	60
83	767555-5	32	HSIL	NEG	322,57	NIC 3	1	30	70
84	767619-7	30	HSIL	NEG	14,89	CERVICITE	2	80	20
85	768338-2	27	INVASOR	POS	167,22	NIC 3	1	50	50
87	768433-8	46	HSIL	POS	11,07	NIC 3	1	109	223
89	768429-7	28	HSIL	NEG	0,41	CERVICITE	1	45	55
92	766221-9	34	HSIL	NEG	0,54	NIC 2	0	0	1
93	770092-1	29	ASC	NEG	0,18	NIC 2	3	100	0
95	191192-7	47	INFL.	NEG	0,69	NIC 1	2	107	68
96	772103-1	45	HSIL	NEG	506,69	NIC 3	1	20	80
97	527269-8	31	HSIL	NEG	707,64	NIC 3	3	75	25
98	773584-6	45	HSIL	NEG	0,67	CERVICITE	1	0	90
100	775399-3	32	HSIL	NEG	1156,56	NIC 2	2	63	39
102	775398-9	28	LSIL	NEG	0,11	CERVICITE	3	56	18
103	475082-5	26	HSIL	NEG	34,75	NIC 2	1	96	137
104	767159-7	30	HSIL	NEG	8,30	NIC 3	3	95	5

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
105	767984-0	50	HSIL	POS	9,50	NIC 3	1	90	10
106	776933-2	37	ASC	NEG	2,82	NIC 3	2	105	52
107	768618-0	26	HSIL	NEG	1769,12	NIC 3	2	203	55
109	777864-2	28	HSIL	NEG	1472,25	NIC 3	2	75	25
110	778694-2	29	HSIL	NEG	2017,87	NIC 2	3	80	20
111	779272-5	42	HSIL	NEG	0,12	NIC 2	1	10	90
112	771894-5	30	ASC	NEG	184,82	NIC 3	0	0	1
113	758730-6	22	ASC	NEG	0,13	NIC 3	3	177	42
114	784409-5	39	INFL.	POS	36,01	NIC 2	1	35	65
115	199661-4	47	HSIL	NEG	894,06	NIC 1	1	30	70
116	785810-5	47	INVASOR	POS	539,73	NIC 3	3	213	169
117	511512-3	46	HSIL	NEG	7,37	NIC 3	2	116	156
119	758404-9	32	HSIL	POS	1486,84	NIC 1	2	80	20
120	787500-6	22	LSIL	POS	114,50	NIC 2	1	15	85
121	797206-0	26	HSIL	NEG	12,97	NIC 1	1	20	80
122	482608-2	27	HSIL	POS	1930,25	NIC 2	0	0	1
124	798109-3	35	HSIL	NEG	410,06	NIC 1	3	100	1
128	800567-0	28	HSIL	NEG	135,02	NIC 3	0	0	1
129	800486-0	34	HSIL	NEG	172,75	NIC 3	3	40	60
133	800590-7	47	HSIL	NEG	401,42	NIC 2	3	90	10
135	800565-2	46	HSIL	NEG	105,59	NIC 3	2	87	13
136	800510-7	26	HSIL	NEG	415,45	NIC 3	3	100	1
138	798860-9	27	HSIL	NEG	664,72	NIC 3	1	35	65
139	809121-5	40	ASC	NEG	2,21	CERVICITE	3	114	65
140	809119-2	36	HSIL	NEG	48,96	NIC 3	0	0	1
141	809124-7	30	HSIL	NEG	0,20	NIC 2	3	132	27
142	801012-2	42	HSIL	POS	570,92	NIC 3	2	75	25
145	546746-5	36	HSIL	NEG	84,44	NIC 3	0	0	1
146	802313-1	26	HSIL	NEG	48,71	CERVICITE	3	126	80
147	802411-9	33	HSIL	NEG	439,15	NIC 3	0	0	1
148	802361-8	40	HSIL	NEG	5,17	NIC 1	2	165	92
150	809134-2	39	HSIL	NEG	50,12	NIC 3	0	0	1
154	802431-9	29	HSIL	NEG	390,17	NIC 1	1	30	70
156	805014-8	28	HSIL	NEG	79,87	NIC 1	2	68	21
158	809144-7	38	HSIL	POS	1581,91	NIC 3	3	75	25
160	815187-9	23	HSIL	NEG	201,38	NIC 3	0	0	1
163	811733-6	38	HSIL	NEG	196,69	NIC 3	3	100	0
164	814834-7	29	HSIL	NEG	4,31	NIC 3	1	80	20
165	807282-1	35	HSIL	NEG	144,23	NIC 3	2	80	20
168	813768-5	33	HSIL	NEG	579,02	NIC 3	1	15	85

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
169	811019-8	27	HSIL	NEG	2150,48	NIC 3	3	75	25
170	813494-6	27	HSIL	NEG	356,31	NIC 3	3	90	10
175	370398-8	42	HSIL	NEG	1247,04	NIC 3	3	100	0
176	825100-9	31	HSIL	NEG	85,31	NIC 3	3	100	0
178	823475-8	33	HSIL	NEG	46,47	NIC 3	2	65	35
181	818555-1	47	HSIL	NEG	179,58	NIC 3	3	85	15
182	811804-1	32	HSIL	NEG	23,56	NIC 3	0	0	1
185	249347-9	38	HSIL	NEG	139,04	NIC 3	3	247	134
186	810587-8	60	HSIL	NEG	206,15	NIC 3	3	70	30
187	179367-4	33	HSIL	NEG	39,26	NIC 2	1	15	85
190	825982-5	38	HSIL	NEG	188,93	NIC 3	0	0	1
197	820268-2	27	HSIL	NEG	321,49	NIC 3	3	209	105
200	823947-1	23	ASC	NEG	5,34	NIC 3	3	100	0
202	829593-8	24	HSIL	NEG	1408,72	NIC 2	2	80	20
203	823851-6	30	HSIL	POS	240,77	NIC 3	2	35	65
206	826954-5	39	HSIL	POS	65,93	NIC 3	0	0	1
207	828105-0	31	LSIL	POS	244,84	NIC 2	0	0	1
209	809534-6	31	INFL.	NEG	0,77	NIC 2	1	30	70
210	802506-0	34	HSIL	NEG	1754,47	NIC 3	1	257	165
211	682181-2	45	HSIL	POS	1498,69	NIC 3	1	5	95
212	829823-1	33	HSIL	NEG	219,04	NIC 3	3	259	170
213	833680-3	43	INVASOR	NEG	15,56	NIC 3	3	90	10
214	827657-6	19	INFL.	NEG	857,64	NIC 3	2	90	10
215	835211-2	26	INFL.	NEG	1206,94	NIC 3	3	90	10
217	775410-3	47	HSIL	NEG	692,00	NIC 2	3	30	70
219	833467-9	23	INFL.	POS	0,69	NIC 3	0	0	1
222	829311-8	52	HSIL	NEG	31,07	NIC 3	1	15	85
224	832006-4	28	HSIL	NEG	100,56	NIC 3	1	15	85
225	710372-2	52	HSIL	NEG	52,51	NIC 3	2	80	20
226	815188-3	29	INFL.	NEG	7,18	NIC 3	1	25	75
228	495672-2	20	HSIL	NEG	3,79	NIC 3	3	90	10
229	836781-4	47	HSIL	NEG	9,18	NIC 3	3	65	35
230	830712-1	31	HSIL	NEG	0,52	NIC 3	0	0	1
231	833153-0	27	HSIL	NEG	12,8	NIC 3	2	302	122
232	463703-9	25	HSIL	NEG	1303,01	NIC 1	2	90	47
234	833620-3	43	ASC	NEG	85,87	NIC 3	1	104	147
236	831717-8	40	HSIL	NEG	33,12	NIC 3	3	92	10
238	811427-9	28	LSIL	NEG	406,47	NIC 1	2	74	63
239	841242-1	45	HSIL	NEG	2,05	NIC 3	3	196	79
242	817979-4	34	HSIL	POS	103,81	NIC 3	0	0	1

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
245	842150-9	26	INFL.	NEG	0,25	NIC 3	0	0	1
246	841484-1	44	HSIL	NEG	140,16	NIC 3	3	147	159
247	214466-2	32	HSIL	NEG	379,66	NIC 2	0	0	1
248	839779-2	24	HSIL	POS	60,52	NIC 3	1	35	65
249	842968-4	40	HSIL	NEG	342,02	NIC 3	2	350	147
250	842716-9	35	HSIL	NEG	184,64	NIC 3	0	0	1
251	840286-0	41	ASC	NEG	379,01	NIC 3	0	0	1
252	833172-6	20	ASC	NEG	21,46	NIC 3	2	85	15
253	812932-1	38	HSIL	NEG	56,82	NIC 3	3	92	90
254	844170-3	27	HSIL	NEG	82,45	NIC 3	3	65	35
255	839777-4	45	HSIL	NEG	93,28	NIC 3	3	70	30
259	848121-0	44	INFL.	NEG	17,86	NIC 1	0	0	1
262	840632-3	31	ASC	POS	3,75	NIC 3	2	130	99
264	847951-6	50	HSIL	NEG	344,64	NIC 3	0	0	1
265	850264-0	36	HSIL	NEG	85,93	NIC 2	0	0	1
267	757728-6	49	ASC	NEG	0,21	NIC 1	3	177	50
270	855155-8	30	HSIL	NEG	182,29	NIC 3	3	100	0
272	848099-1	65	ASC	POS	202,66	NIC 3	0	0	1
274	651029-7	36	HSIL	NEG	17,47	NIC 3	1	45	55
276	865360-3	39	INFL.	NEG	1373,39	NIC 3	2	90	10
278	872033-9	42	LSIL	NEG	44,92	NIC 3	2	78	52
279	196238-2	37	HSIL	POS	10,86	NIC 2	3	86	8
280	868386-8	23	HSIL	NEG	3,98	NIC 3	3	85	15
281	219143-7	41	HSIL	NEG	493,56	NIC 3	3	80	20
282	868733-4	38	HSIL	NEG	0,38	NIC 3	2	116	110
283	867294-2	33	HSIL	POS	95,73	NIC 3	2	105	237
284	797282-4	40	HSIL	NEG	663,61	NIC 3	1	15	85
286	873148-7	54	HSIL	NEG	80,74	NIC 3	0	0	1
287	839798-8	29	ASC	NEG	10,36	NIC 3	1	40	60
290	872181-2	31	INFL.	NEG	2,92	NIC 3	3	129	22
292	868139-3	41	HSIL	POS	539,46	NIC 3	3	129	137
294	871324-9	33	HSIL	NEG	99,8	NIC 3	2	159	59
295	862843-4	31	HSIL	POS	39,87	NIC 3	2	127	90
297	877356-4	35	ASC	NEG	67,21	NIC 3	1	15	85
299	874077-9	22	INFL.	POS	527,69	NIC 1	0	0	1
301	875989-3	22	LSIL	NEG	926,28	NIC 2	1	54	42
302	875925-7	28	HSIL	NEG	0,44	NIC 3	1	30	70
305	879948-7	26	HSIL	NEG	52,59	NIC 3	2	241	77
306	871962-7	26	INFL.	NEG	249,5	NIC 2	1	90	144
314	880912-3	59	HSIL	NEG	253,64	NIC 3	3	70	30

Número	HC	Idade	Citologia	20% clue cell	CHII	Anátomo-patológico	Intensidade COX	Positivo COX campo 1	Negativo COX campo 1
319	881788-7	34	ASC	NEG	29,17	NIC 3	2	80	20
321	88452051	42	HSIL	NEG	14,69	CERVICITE	3	70	30
322	8500939	52	AGC	NEG	16,81	NIC 3	0	0	1
324	6913629	26	INFL.	NEG	0,45	NIC 3	0	0	1
325	8644402	43	HSIL	NEG	289,59	NIC 3	1	20	80
326	8652148	30	INVASOR	POS	352,59	NIC 3	1	15	85
328	2579942	43	AGC	NEG	0,22	NIC 1	1	15	85
329	8815671	45	HSIL	NEG	20,36	NIC 2	1	15	85
330	8927541	51	ASC	NEG	0,33	NIC 1	2	90	10
335	8073695	43	AIS	NEG	126,48	NIC 3	3	80	20
338	7965475	34	AGC	NEG	14,80	NIC 3	1	80	20
340	8148397	41	HSIL	NEG	752,48	CERVICITE	3	85	15
341	8147973	53	HSIL	NEG	73,42	NIC 3	3	85	15
342	1586247	47	HSIL	NEG	138,56	NIC 2	3	132	27
343	8156706	40	AGC	NEG	1885,67	NIC 3	3	100	0
344	8093885	18	ASC	NEG	2,21	CERVICITE	3	114	65
345	8173661	34	AGC	NEG	0,37	NIC 1	2	69	69
346	8199439	33	AGC	NEG	0,46	NIC 1	3	76	59
347	8224597	55	HSIL	NEG	32,79	NIC 3	0	0	1
348	8319489	56	HSIL	NEG	622,82	NIC 3	2	80	20
349	8256813	40	HSIL	NEG	267,55	NIC 3	2	70	91
350	8256904	32	HSIL	NEG	176,25	NIC 2	1	96	137
353	718956	41	HSIL	NEG	442,75	NIC 3	3	90	10
354	8302680	46	HSIL	NEG	25,64	NIC 2	3	100	0
355	8311845	47	AGC	NEG	0,42	NIC 1	2	74	63
356	8326656	39	HSIL	NEG	686,34	NIC 3	3	100	0
357	4542129	28	ASC	NEG	30,32	NIC 2	3	80	20
358	8391273	52	AGC	NEG	0,37	NIC 1	1	65	35
359	8391419	30	AGC	NEG	0,33	NIC 1	2	70	30
362	8420585	63	HSIL	NEG	1447,03	NIC 3	2	75	25
363	8435350	38	HSIL	NEG	60,98	NIC 3	0	0	1

7.4. Anexo 4 – Mini-curriculum da candidata desde o seu ingresso na pós-graduação

Mestrado

“Detecção do DNA-HPV de alto risco oncológico antes e quatro a seis meses após conização em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical”. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) - Universidade Estadual de Campinas/2000. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sophie Françoise Mauricette Derchain.

Trabalhos publicados na íntegra em periódicos indexados no Scielo ou Pubmed

Figueiredo PG, Gontijo RC, Derchain SFM, Nakano FY, Teixeira JC, Martinez EZ. Carcinoma microinvasor no cone após biópsia dirigida compatível com NIC 3. **RBGO** 2002; 24:37-43.

Figueiredo PG, Derchain SFM, Sarian LOZ, Gontijo RC, Andrade LALA, Campos EA, Martinez EZ. Detecção do DNA do Papillomavirus humano após excisão da zona de transformação com alça diatérmica para tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical. **RBGO** 2003; 25:9-15.

Sarian LOZ, Derchain SFM, Santos ALF, Figueiredo PG, Morais SS. Carga viral do Papillomavirus humano na predição da gravidade de lesões cervicais em mulheres com atipias celulares na colpocitologia oncológica. **RBGO** 2003; 25:365-370.

Sarian LOZ, Derchain SFM, Pitta DR, Andrade LALA, Moraes SS, Figueiredo PG. Human Papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Tumori* 2005; 91:189-193.

Resumos em periódicos

Figueiredo PG, Derchain SFM, Nakano FY, Gontijo RC, Tambascia J, Andrade LALA. Detecção do DNA-HPV antes e após conização em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. *RBAC* 2002;32:21b.

Derchain SFM, Figueiredo PG, Nakano FY, Gontijo RC, Tambascia J, Martinez EZ. Excisão da zona de transformação com alça larga sem biópsia prévia na neoplasia intra-epitelial cervical grau 2 ou 3. *RBAC* 2002; 34:21b.

Trabalhos apresentado em congressos

Figueiredo PG, Derchain SFM, Nakano FY, Dragozovac S, Barbosa SB, Huguet P. Achados histológicos no cone de mulheres submetidas à conização por biópsia colpodirigida compatível com NIC 3. In: VII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000, Belo Horizonte, MG. Anais do VII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000. p. 4-4.

Figueiredo PG, Derchain SFM, Nakano FY, Dragozovac S, Medeiros LB, Huguet P. Correlação entre a citologia e a biópsia colpodirigida em mulheres submetidas à conização por CAF. In: VII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000, Belo Horizonte. Anais do VII Simpósio Internacional de Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital inferior e Colposcopia, 2000. p. 5-5.

Oliveira ERZM, Figueiredo PG, Nakano FY, Derchain SFM, Panetta K, Martinez EZ. Fatores associados com o comprometimento das margens na avaliação histológica de cones com NIC 3. In: VII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000, Belo Horizonte, MG. Anais do VII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000. p. 11-11.

Figueiredo PG, Derchain SFM, Nakano FY, Dragozovac S, Medeiros LB, Huguet P, Teixeira JC. Fatores associados à presença de doença residual no novo cone ou histerectomia após conização a frio ou por cirurgia de alta frequência por NIC 3. In: VII Simpósio Internacional da Sociedade de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000, Belo Horizonte, MG. Anais do VII Simpósio Internacional da Sociedade de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2000. p. 12-12.

Figueiredo PG, Tambascia J, Sarian LOZ, Gontijo RC, Martinez EZ, Derchain SFM. Detecção do DNA-HPV de alto risco oncológico no seguimento de mulheres submetidas à conização por neoplasia intra-epitelial cervical. In: VIII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2002, Campo Grande. Anais do VIII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia, 2002. p. 37-37.

Sarian LOZ, Figueiredo PG, Nakano FY, Tambascia J, Martinez EZ, Derchain SFM. Acurácia diagnóstica da conização por cirurgia de alta frequência (CAF) em mulheres com resultado da colpocitologia compatível com NIC 2 ou 3. In: VII Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, 2002, São Paulo. Anais do VII Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, 2002. p. 85-85.

Sarian LOZ, Figueiredo PG, Derchain SFM, Andrade LALA, Paula N. Human papillomavirus detection after large loop excision of the transformation zone in women with cervical intraepithelial neoplasia. In: XVII FIGO World Congress, 2003, Santiago - Chile. XVII FIGO World Congress, 2003. v. 5. p. 58-58.

Sarian LOZ, Zeferino LC, Derchain SFM, Figueiredo PG, Tambascia J, Campos E, Morais SS. HPV-DNA detection following LLETZ conization: two years follow-up. In: HPV 21st International Conference and Clinical Workshop, 2004, México. Final Program HPV 21st International Conference and Clinical Workshop, 2004. p. 150-150.

Sarian LOZ, Derchain SFM, Figueiredo PG, Gontijo RC, Morais SS, Syrjanen K. Cytology and Hybrid Capture II performances in detecting CIN recurrence during 24 months follow-up of women submitted to LLETZ conization. In: HPV 21st International Conference and Clinical Workshop, 2004, México. Final Program HPV 21st International Conference and Clinical Workshop, 2004. p. 228-228.