



MARIA GABRIELA LOFFREDO D'OTTAVIANO

**DETECÇÃO DOS TIPOS DE HPV E INTEGRAÇÃO DO HPV DNA 16
EM MULHERES COM NIC 2 SEGUIDAS POR DOZE MESES**

***HPV DETECTION AND HPV DNA 16 INTEGRATION IN
WOMEN WITH CIN 2 FOLLOWED UP FOR 12 MONTH***

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIA GABRIELA LOFFREDO D'OTTAVIANO

**DETECÇÃO DOS TIPOS DE HPV E INTEGRAÇÃO DO HPV DNA 16
EM MULHERES COM NIC 2 SEGUIDAS POR DOZE MESES**

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO
COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS

***HPV DETECTION AND HPV DNA 16 INTEGRATION IN
WOMEN WITH CIN 2 FOLLOWED UP FOR 12 MONTH***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde, na área de concentração em Oncologia Ginecológica e Mamária.

*Doctorate thesis submitted to the Programme of Obstetrics and Gynecology of the
Unicamp's Faculdade de Ciências Médicas for obtaining the title of Doctor in
Health Sciences in the concentration area of Breast and Gynecologic Oncology.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNA MARIA GABRIELA LOFFREDO D'OTTAVIANO
E ORIENTADA PELO Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO

Assinatura do Orientador

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

D742d D'Ottaviano, Maria Gabriela Loffredo, 1969-
Detecção dos tipos de HPV e integração do HPV DNA 16 em
mulheres com NIC 2 seguidas por 12 meses / Maria Gabriela
Loffredo D'Ottaviano. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador : Luiz Carlos Zeferino.
Coorientador : Sílvia Helena Rabelo dos Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vírus do papilloma humano. 2. Neoplasias do colo do útero.
3. Vírus do papilloma humano tipo 16. 4. Integração viral. I.
Zeferino, Luiz Carlos, 1955-. II. Santos, Sílvia Helena Rabelo dos.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: HPV detection and HPV DNA 16 integration in women with CIN2 followed up for 12 month.

Palavras-chave em inglês:

Human papillomavirus
Uterine cervical neoplasms
Human papillomavirus type 16
Viral integration

Área de concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luiz Carlos Zeferino [Orientador]
Paulo César Giraldo
Joana Fróes Bragança Bastos
Francisco José Candido do Reis
Rosany Mucha Duflath

Data da defesa: 19-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: MARIA GABRIELA LOFFREDO D'OTTAVIANO

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ZEFERINO

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. SILVIA HELENA RABELO DOS SANTOS

Membros:

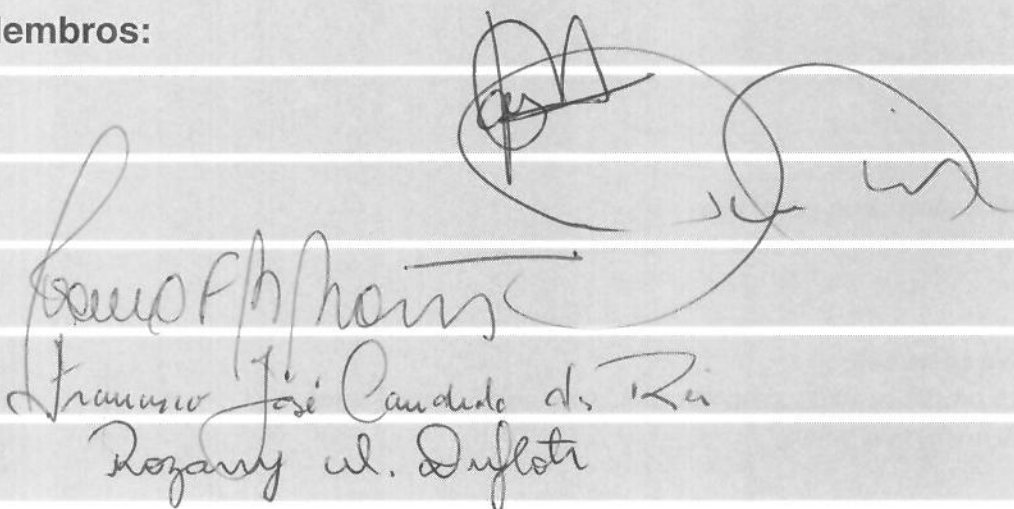
1.

2.

3.

4.

5.


Francisco José Cândido do Rei
Rozany M. Dufloth

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

Data: 19/12/2012

Dedico este trabalho...

*aos meus pais, Itala e Roberto,
pelos ensinamentos ao longo da trilha da vida.*

*Aos meus pequenos
Anna Clara, Francisco, João, Beatriz, Arthur, Bruna e André,
pelos sorrisos e olhares.*

*Ao João Guilherme,
companheiro de tantas horas.*

Aos sempre queridos Camila, Marcelo, Fabrício e Fernanda.

E a todos aqueles que me são importantes...

Agradecimentos

Agradeço ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, pela dedicação e competência, sem o que esta tese não teria sido possível.

Agradeço também à Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo do Santos pela orientação e apoio.

À Profa. Dra. Liliana Aparecida de Lucci Andrade, sempre ao lado dos alunos, pela realização e revisão dos exames histopatológicos.

Ao colega Carlos André Sheler de Souza, pelo trabalho em conjunto no atendimento das mulheres.

Ao grupo de virologia do Instituto Ludwig de Pesquisa.

À Michelle Garcia Discacciati de Carvalho, pela atenção, organização e generosidade na realização dos trabalhos desse grupo de pesquisa.

E, sempre, à equipe da ASTEC, pela editoração e finalização da tese.

E, finalmente, aos meus filhos, Anna Clara e Francisco, pela paciência...

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	vii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. Sujeitos e Método	23
3.1. Seleção de sujeitos	23
3.2. Detecção do DNA-HPV e Genotipagem	25
3.3. <i>Status</i> físico do HPV.....	26
4. Publicações	27
4.1. Artigo 1	28
4.2. Artigo 2	44
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	65
8. Anexos	71
8.1. Anexo 1 – Carta Convite às Pacientes.....	71
8.2. Anexo 2 – Consentimento Livre e Esclarecido	73
8.3. Anexo 3 – Parecer do CEP	75

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ASCCP – *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*

ASCUS – *Atypical squamous cells of undetermined significance*
(células atípicas de significado ideterminado)

CIN – *Cervical intraepithelial neoplasia*

DNA – Ácido desoxiribonucleico

E2 – gene E 2 do papilomavírus humano

E6 – gene E 6 do papilomavírus humano

E7 – gene E 7 do papilomavírus humano

HPV – Papilomavírus humano

HSIL – *High grade squamous intraepithelial lesion*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LSIL – *Low grade squamous intraepithelial lesion*

NIC – Neoplasia intraepitelial cervical

p16 – Proteína 16

p27 – Proteína 27

p53 – Proteína 53

PCR – *Polymerase chain reaction*

pRB – Proteína do Retinoblastoma

SCC – *Squamous cervical carcinoma*

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

A infecção pelo HPV é considerada fator etiológico da neoplasia do colo do útero e a integração do HPV DNA ao DNA da célula hospedeira é apontada como passo importante na carcinogênese do epitélio. O melhor conhecimento da infecção dos vários tipos de HPV e o *status* físico do HPV 16 nas NIC 2 podem colaborar na identificação das lesões que teriam maior risco de progredir para NIC 3 e, portanto, deveriam ser consideradas como lesões precursoras do câncer do colo uterino. O objetivo desta série de casos foi descrever a presença dos diferentes tipos de HPV e a integração do HPV DNA 16 em mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 acompanhadas por 12 meses. Trinta e sete mulheres com citologia inicial, resultado de lesão de baixo grau e atipias de células escamosas de significado indeterminado e NIC 2, confirmado por biópsia, foram seguidas por 12 meses com citologia, colposcopia, tipagem de HPV e determinação do *status* físico do HPV DNA 16 a cada três meses. A evolução clínica da NIC 2 foi classificada como regressão em 49% (18\37) dos casos, persistência em 22%(8\37) e progressão em 29% (11\37). A infecção por múltiplos tipos de HPV foi observada em 41% (15\37) dos casos na admissão e durante o seguimento 54% (20\37) dos casos apresentaram infecção por novos tipos de HPV. O HPV 16 foi considerado

como possível causa em 67% (10\15) dos casos que persistiram ou progrediram e em 10% (1\10) dos que regrediram ($p=0,01$). Entre as 20 mulheres que apresentaram HPV 16 na admissão, a forma integrada foi detectada em 25% dos casos e a forma episomal em 75% dos casos. Não foram observados casos de progressão para NIC 3 sem integração do HPV DNA 16 em algum momento do seguimento. Entretanto, foram observados casos de integração do HPV DNA 16 e regressão da NIC 2. Concluindo, a infecção por múltiplos tipos de HPV é frequente nas mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2, assim como a infecção por outros tipos de HPV durante o seguimento de 12 meses. As NIC 2 associadas à detecção do HPV 16 persistem ou progridem com maior frequência. As NIC 2 que progrediram para NIC 3 apresentaram o HPV DNA 16 na forma integrada na admissão ou em algum momento do seguimento.

Summary

Human papillomavirus (HPV) persistent infection is considered a necessary cause for the development of cervical cancer and HPV DNA integration considered an important step in the progression of persistent high risk HPV infection to invasive cancer. The knowledge of HPV infection and the HPV DNA 16 physical status in women with cervical intraepithelial neoplasia grade 2 (CIN 2) can better characterize the biological behavior of the lesion. This case series aimed to describe the HPV types and HPV DNA 16 physical status in women with CIN 2 biopsy proven followed for 12 months and clinical outcome. Thirty seven women with CIN 2 biopsy proven, cervical referral smear showing low-grade squamous intraepithelial lesions or atypical squamous cells of undetermined significance and with HPV type, were followed up 12 months with cervical smear, colposcopy, HPV type and HPV DNA 16 every three months. At the end of twelve months follow-up, the CIN 2 regression rate was 49% (18/37), persistence as CIN1 or CIN 2 was 22% (8/37), and progression to CIN 3 was 29% (11/37). Multiple HPV types were observed at admission in 41% (15/37) of cases. During follow-up, 54% (20/37) of the women showed one or more new HPV type detected. HPV 16 was considered possibly causal type in 67% (10/15) of the cases that persisted or progressed and

in 10% (1/10) that regressed ($p=0.01$). Among the twenty women with HPV DNA 16, at admission, 25% showed integrated HPV DNA 16 and 75% episomal form. There were no cases of CIN 2 progression to CIN 3 without HPV DNA 16 integration, but there were cases of HPV DNA 16 integration and CIN 2 regression. Concluding, multiple HPV infections were frequently detected among women with CIN 2 at admission and during the follow up. The CIN 2 associated with HPV 16 were more likely to persist or to progress to CIN 3. The HPV DNA 16 integration is associated with CIN 2 persistence and progression to CIN 3.

1. Introdução

O carcinoma do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres, independentemente da faixa etária. A Organização Mundial da Saúde estima 500.000 novos casos por ano e 250.000 mortes, a maioria nos países de baixa renda (1). No Brasil, o INCA estima para 2012 uma incidência de 13 a 39 casos para cada 100.000 mulheres, variando de acordo com a região do país (2).

Originalmente acreditava-se que o carcinoma escamoso invasor do colo do útero evoluiria a partir do epitélio normal da cérvix uterina, após infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), em um processo longo e contínuo, a partir das neoplasias intraepiteliais cervicais: NIC1, NIC2 e NIC3. O conhecimento recente sobre a interação do HPV e o epitélio do colo do útero indicam que a maioria das NIC 1 e algumas NIC 2 não deveriam ser consideradas precursoras do carcinoma de colo uterino, mas apenas efeitos citopáticos de infecção produtiva pelo HPV. Entretanto, algumas lesões NIC 2 ou NIC 3 clinicamente relevantes podem ser induzidas rapidamente após a infecção pelo HPV e levar 10 a 12 anos para progredirem para carcinoma invasor (3).

O HPV foi detectado em 99% dos cânceres do colo uterino, razão pela qual é considerado necessário, mas não seria suficiente para o desenvolvimento

das neoplasias intraepiteliais e do câncer do colo uterino (4). As infecções são transitórias em até 80% dos casos, sendo o câncer uma rara complicação da infecção pelo HPV de alto risco, que requer uma série de eventos e condições adicionais para a transformação neoplásica (3).

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados e classificados de acordo com vários critérios: tropismo, potencial oncogênico e classificação filogenética. Em relação ao tropismo, mais de 30 tipos são comumente encontrados no trato genital em lesões benignas e malignas (5,6). Os tipos de HPV são designados de alto e baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas a progressão maligna (7).

Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico, associados aos condilomas acuminados, são representados principalmente pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72 e 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem frequentemente associados a NIC de alto grau e as neoplasias invasoras são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (8).

Filogeneticamente, os HPV estão divididos em papilomavirus gêneros alfa, beta, gama, um, e ni. O alfa-papilomavirus é o gênero de maior importância clínica porque contém as espécies 7, 9 e 10, que incluem os tipos de alto risco oncogênico, o HPV 18 (espécie 7) e o HPV 16 (espécie 9), além dos tipos não oncogênicos 6 e 11 (espécie 10) associados às verrugas genitais (7).

O genoma do HPV é composto por oito regiões conhecidas como fases de leitura aberta (Open Reading Frames) e uma região não codificada que contém

elementos regulatórios. As fases de leitura são organizadas em três regiões: região precoce composta por E1, E2, E4, E5, E6, E7; região tardia composta por L1 e L2; região reguladora (URR).

A infecção inicial pelo HPV requer acesso de partículas virais às células da camada proliferativa basal através de uma microfissura no epitélio cervical. Após a infecção, acredita-se que o vírus mantenha seu genoma com baixo número de cópias sob forma episomal nas células da camada proliferativa basal. Nesta fase, dependente dos genes E1 e E2, há um baixo nível de expressão das proteínas virais E6, E7, E1 e E2, suficiente para a manutenção genômica do vírus. Para a produção de partículas virais ocorre a amplificação do genoma do HPV, que é dependente da expressão dos genes E6 e E7. A montagem das partículas infecciosas ocorre nas camadas médias e superiores do epitélio cervical, para a qual há um aumento da expressão dos genes virais E1, E2, E4 e E5. Na fase mais final, os genes L1 e L2 codificam as proteínas da cápsula viral (9).

Na infecção produtiva, que caracteriza as lesões de baixo grau, o ciclo reprodutivo do HPV é mantido. Por outro lado, a interrupção do ciclo reprodutivo do HPV, mas com manutenção da atividade viral, é o que caracteriza a infecção transformante e tumoral, presente nas lesões de alto grau e nos carcinomas invasivos (9).

Os genes virais E6 e E7 atuam em duas etapas distintas do ciclo celular: no controle da passagem da fase G1 para S e na regulação da entrada da célula em apoptose. Depois de um padrão aberrante de expressão das proteínas virais E6 e E7 nas células proliferativas, a proteína E7 liga-se e inibe a atividade da

proteína do retinoblastoma (pRb) levando a uma diminuição em seus níveis. A pRb tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. O E2F, quando livre, ativa diversas quinases dependentes de ciclinas, desencadeando o processo de replicação do DNA. A pRb também atua sobre uma proteína supressora de tumor que age como o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A, chamado abreviadamente de p16, e sobre o inibidor de ciclina dependente de quinase 1 B, ou p27, os quais são importantes moduladores da parada do ciclo celular em G1. Em síntese, a proteína viral E7 atua reduzindo as concentrações de pRb e, por conseguinte, p16 e p27, acarretando o aumento de concentração de ciclinas dependentes de quinases em pleno funcionamento, consequentemente permitindo a entrada e manutenção da célula em fase S (10). O HPV exerce papel nocivo ao controle da apoptose através de sua proteína E6, a qual se liga ao produto do gene P53, ou proteína p53, degradando-a. Desta forma, a proteína viral E6, que se liga e degrada a p53, impede a transcrição de p21, que inibiria a passagem da célula de G1 para S, ao mesmo tempo que impede a morte de células com DNA alterado (11).

Como resultado da infecção viral transformante, associada aos HPV de alto risco, a constante ativação das proteínas virais E6 e E7 leva a uma instabilidade genômica crescente, acúmulo de mutações no genoma com posterior perda do controle de crescimento celular, levando à transformação neoplásica (12).

A infecção pelo HPV de alto risco é comum, mas com frequência as infecções regridem espontaneamente. Estima-se um risco de contrair infecção pelo HPV de 80% ao longo da vida, sendo que a maioria dessas infecções será

transitória (13). Isso é bastante evidente em mulheres jovens (média de idade 25 anos), quando a prevalência estimada da infecção do HPV de alto risco é de aproximadamente 20% a 40%, dependendo da localização geográfica, com declínio da incidência à medida que a idade das mulheres aumenta (14). Entretanto, como exposto anteriormente, a infecção pelo HPV de alto risco na presença de eventos e condições adicionais pode levar a transformações neoplásicas na célula hospedeira.

Os oito tipos de HPV responsáveis por 80% dos carcinomas do colo do útero, em ordem decrescente de prevalência são: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35 (15-18). Sabe-se que tipos específicos de HPV determinam diferentes riscos para a persistência e progressão das alterações celulares determinadas pelo vírus. O HPV 16 foi detectado em 54% a 55% dos carcinomas e em 45% das NIC2 e NIC 3 (8,13). Estudo de coorte com aproximadamente 20.000 mulheres, seguidas por 10 anos, mostrou que aquelas com infecção pelo HPV 16 no início do estudo apresentavam um risco de desenvolver NIC 3 ou câncer de colo uterino de 17%, enquanto que entre as mulheres com infecção pelo HPV de alto risco, que não o HPV 16, este risco seria de 3%. Outros estudos mostraram também que a infecção pelo HPV 16 representa maior risco oncogênico em relação aos outros tipos de HPV (20,21).

Em nível molecular, a conversão de uma infecção produtiva em transformante é detectada pelo aumento da expressão das proteínas virais E6 e E7 nas células basais e pela produção de partículas virais em menor proporção, restrita a pequenas áreas próximas à superfície epitelial. A integração do genoma do HPV no DNA da célula hospedeira caracteriza-se pela produção das

proteínas virais E2 e E1 anômalas, enquanto as proteínas E6 e E7 geralmente se mantêm intactas. Com a perda da função da proteína E2, devido à integração, ocorre a superexpressão das proteínas virais E6 e E7 nas células proliferativas, o que pode induzir à instabilidade cromossômica, tanto em nível numérico como estrutural, o que caracteriza a lesão transformante. A integração do HPV DNA 16 pode ser determinada através do método de PCR em tempo real, pela relação dos valores do número de cópias dos genes virais E2 e E6 (22).

A frequência de integração viral parece aumentar com o grau de severidade da doença, ou seja, em lesões de alto grau e em carcinoma invasor as taxas encontradas de HPV DNA 16 integrado são maiores do que as encontradas em lesões de baixo grau (23, 24, 25). Entretanto, a importância biológica da integração ainda é motivo de discussão e estudos indicam que as formas episomal e integrada coexistem, podendo ser encontradas não só em lesões de alto grau e carcinomas invasores, mas também em lesões de baixo grau ou até mesmo em epitélio do colo do útero (26,27). A integração, ao levar a superexpressão dos genes virais E6 e E7, favorece a seleção de clones de células com expressão gênica otimizada (23).

Mulheres sem anormalidades do colo uterino, porém com infecção pelo HPV 16, desenvolvem lesões pré-neoplásicas mais severas e mais rapidamente quando comparadas com mulheres infectadas por outros tipos de HPV de alto risco (28) Dependendo do tipo de HPV, pode haver variação no grau de instabilidade cromossômica na célula hospedeira durante a progressão de uma infecção pelo HPV de alto risco até o câncer do colo uterino invasor (29).

A integração do HPV DNA 16 no genoma da célula é um passo importante na progressão das lesões precursoras. Porém, apesar da integração do HPV 16 estar fortemente ligada à instabilidade cromossômica, ainda não está claro se ela seria a causa ou simplesmente a consequência da instabilidade genômica (29). A ausência do HPV DNA 16 integrado em alguns carcinomas indica que a integração não é sempre necessária para a progressão maligna (30,31).

A NIC 2 é uma lesão classificada, dentro das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), pelo Sistema Bethesda para classificação dos resultados da citologia (32), mas pode apresentar comportamento semelhante à NIC 1, sendo apenas consequência do efeito citopático da infecção pelo HPV, com padrões de expressão das proteínas virais sugestivos de infecções produtivas (1,10).

Um estudo que acompanhou mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 e idade média de 25 anos, selecionadas a partir de citologia com achados de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), mostrou 74% de regressão espontânea após um ano de seguimento (33). Estudo semelhante em mulheres adolescentes e jovens mostrou taxa de regressão de 70% (34). Ambos os estudos, o primeiro pelo critério citológico de seleção e o segundo pela idade, provavelmente selecionaram mulheres com infecção produtiva de HPV, cuja resolução espontânea é o evento clínico mais frequente. Além disso, outros fatores, tais como presença de HPV 16, paridade da mulher, infecções associadas, tabagismo, uso de anticoncepcional combinado oral, influenciam no desfecho clínico das NIC 2 (34).

A possibilidade de seguimento sem tratamento tem sido recomendada para adolescentes e mulheres jovens com diagnóstico de NIC 2 confirmando por biópsia (35). Esta abordagem mais conservadora faz-se necessária pelo balanço dos benefícios e das complicações. Há evidências importantes de que procedimentos no colo do útero para tratamento de NIC, cirúrgicos ou mesmo eletrocoagulação radical, podem resultar em complicações obstétricas e neonatais (36,37).

O consenso de 2007 da *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP) (38) recomenda que mulheres adolescentes e jovens com diagnóstico por biópsia de NIC 2 podem ter o tratamento imediato substituído pelo seguimento a cada 6 meses, com exame citológico e colposcopia por um período de 24 meses. Para as mulheres com NIC 2 fora desse grupo etário, a conduta recomendada é cauterização ou tratamento por excisão cirúrgica da lesão.

Assim, considerando-se o baixo risco de progressão da NIC 2 e os possíveis efeitos adversos resultantes do tratamento, um melhor conhecimento do padrão da infecção pelo HPV e do papel do *status* físico do HPV DNA 16 presente na NIC 2 pode oferecer subsídios para qualificar o cuidado de mulheres que poderiam ser submetidas a uma conduta clínica mais conservadora. Além disso, pode ajudar a identificar quais das NIC 2 teriam maior risco de progredir para NIC 3, características das verdadeiras lesões precursoras do câncer do colo uterino.

Diante disso, o presente estudo, que faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no CAISM, UNICAMP, para acompanhar mulheres com NIC 1 e NIC 2, descreve a detecção dos tipos de HPV e a integração do HPV DNA 16 em pacientes com diagnóstico histológico de NIC 2, seguidas por doze meses.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Descrever a presença dos diferentes tipos de HPV e a integração do HPV DNA 16 em mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 acompanhadas por 12 meses.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever a aquisição, persistência e resolução das infecções por HPV em mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 acompanhadas ao longo de 12 meses.
- Testar a associação da presença dos diferentes tipos de HPV com a evolução clínica da NIC 2 em mulheres acompanhadas ao longo de 12 meses.

- Descrever a integração do HPV DNA 16 em mulheres com diagnóstico histológico NIC 2 acompanhadas ao longo de 12 meses.
- Testar a associação da integração do HPV DNA 16 com a evolução clínica da NIC 2 em mulheres acompanhadas ao longo de 12 meses.

3. Sujeitos e Método

3.1. Seleção de sujeitos

Este projeto fez parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no CAISM, UNICAMP, para acompanhar mulheres com NIC 1 e NIC 2. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica e pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP (Anexo 1).

Para o estudo de coorte original, 4.732 mulheres da região de Campinas com citologia com resultado de LSIL e ASCUS foram convidadas; 1.548 mulheres responderam ao convite e aceitaram participar. Para o presente estudo foram selecionadas 50 mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2, que aceitaram participar e assinaram o consentimento livre esclarecido (Anexo 2).

Os critérios de inclusão no presente estudo foram:

- 1) segunda citologia com resultado de LSIL ou ASCUS;
- 2) diagnóstico histológico de NIC 2;
- 3) lesão e junção escamocolumnar totalmente visível na colposcopia;

- 4) não estar grávida;
- 5) sem sinais de imunodeficiência;
- 6) sem antecedentes de neoplasia;
- 7) endereço fixo ou pelo menos com um número de telefone fixo;
- 8) tipagem de HPV na inclusão do estudo.

Dessas 50 mulheres, 13 foram descontinuadas, a saber: uma apresentou teste HIV positivo; uma engravidou; uma faltou a três controles consecutivos; cinco faltaram ao controle de 12 meses; cinco não apresentaram teste de HPV DNA em pelo menos 1 consultas de seguimento.

Portanto, no estudo foram incluídas 37 mulheres, sendo que 20 apresentaram HPV DNA 16 na admissão, sendo então acompanhadas com a detecção *status* físico do HPV DNA 16 por 12 meses.

O seguimento proposto para essas mulheres ao longo de 12 meses foi: citologia, colposcopia, tipagem de HPV DNA e avaliação do *status* físico do HPV DNA 16, quando presente, a cada três meses. Se a colposcopia evidenciou piora da imagem suspeita em relação ao exame anterior, a paciente foi submetida à nova biópsia do colo uterino. Se o resultado da biópsia foi NIC 2 ou lesões menos severas, a paciente foi mantida no seguimento. Entretanto, se o resultado da biópsia foi NIC 3, a paciente foi submetida a tratamento através da excisão da lesão e da zona de transformação. Ao final de 12 meses, todas as pacientes que apresentaram alterações citológicas ou colposcópicas foram submetidas à avaliação histológica

e tratamento conforme o diagnóstico final, de acordo com a conduta do serviço. Nenhum tratamento ablativo foi instituído para essas pacientes.

No presente estudo, a evolução clínica da NIC 2 foi classificada como progressão, persistência ou regressão, com base nos seguintes critérios:

- Progressão: biópsia com resultado de NIC 3 detectada em qualquer momento do seguimento. Nenhum carcinoma invasor foi diagnosticado durante o estudo.
- Persistência: biópsia com resultado de NIC 1 ou NIC 2 ao final de 12 meses de seguimento.
- Regressão: citologia e colposcopia negativas ou biópsia negativa em qualquer controle durante o seguimento e confirmada ao final de 12 meses.

3.2. Detecção do DNA-HPV e Genotipagem

O DNA purificado foi submetido à PCR para DNA de HPV. Foram utilizados os *primers* PGMY09 e PGMY11 que amplificam fragmentos de região L1 (40). Os casos positivos na PCR foram submetidos à genotipagem através de hibridização reversa, em pontos coletados na inclusão das mulheres no estudo e durante seus seguimentos. Os resultados foram representados na forma da variável dicotômica (negativo ou positivo) para DNA de HPV. Quanto à genotipagem, os resultados foram expressos na forma de variável dicotômica (negativo ou positivo) para os seguintes tipos específicos de HPV. 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, MM4 (w13B), MM7(P291), MM9(P238A), 6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, MM8(P155).

3.3. *Status* físico do HPV

A análise do *status* físico do DNA viral foi realizada por PCR em tempo real utilizando a técnica descrita por Peitsaro, Johanson & Syrjanen (22) com modificações (41). Em relação ao *status* físico do DNA viral, os valores foram avaliados com base nas relações de E2:E6 e E2:L1, a distribuição dos resultados obtidos será interpretada da seguinte maneira: valores abaixo de 33% foram classificados com exclusivamente episomais e valores acima do percentil 66, como integrados. As diferenças intermediárias foram consideradas como representando a coexistência de genomas episomais e integrados.

4. Publicações

Artigo 1 – **HPV 16 is related to progression of cervical intraepithelial grade 2: a case series**

Artigo 2 – **Detection of HPV DNA 16 integration in CIN 2 followed up for 12 month: a case series**

4.1. Artigo 1

HPV 16 is related to progression of cervical intraepithelial grade 2: a case series

Maria Gabriela Loffredo D'Ottaviano^a, Michelle Garcia Discacciati^b, Maria Antonieta Andreoli^c, Maria Cecília Costa^c, Lara Termini^c, Silvia H. Rabelo-Santos^d Luisa Lina Villa^c, Luiz Carlos Zeferino^a

- a) Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil
- b) School of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo (USP), Brazil
- c) Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo; HPV Institute (INCT-HPV), School of Medicine, Santa Casa, São Paulo, SP, Brazil
- d) School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Corresponding author:

Luiz Carlos Zeferino
Rua Alexander Fleming, 101
Cidade Universitária Zeferino Vaz
13083-881 Campinas, SP, Brazil
Tel: -55-(19)35219466
e-mail: zeferino@fcm.unicamp.br

Condensation: Multiple HPV infection is frequently detected in CIN 2 lesions, but HPV 16 is more frequent in CIN 2 progressing to CIN 3.

Abstract

Objective: To describe the acquisition, persistence and clearance of HPV infection in women with CIN 2 confirmed by biopsy followed for 12 months under expectant management. *Study*

Design: Thirty seven women with CIN 2 biopsy proven, referral cervical smear showing low-grade squamous intraepithelial lesions or atypical squamous cells of undetermined significance and tested for HPV were included. They were followed up for one year with cervical smear, colposcopy and HPV test every three months. HPV DNA was detected by the polymerase chain reaction (PCR), and genotyping was performed by reverse line blot hybridization assay. The association between HPV 16 with CIN 2 clinical outcome was tested using Fisher's Exact Test. *Results:* At the end of twelve months follow-up, the CIN 2 regression rate was 49% (18/37), persistence as CIN 1 or CIN 2 was 22% (8/37), and progression to CIN 3 was 29% (11/37). Multiple HPV types were observed at admission in 41% (15/37) of cases. During follow-up, 54% (20/37) of the women had one or more new HPV type detected, resulting in eight more women with multiple HPV type detected. HPV 16 was detected at admission in 58% (11/19) of the cases that persisted/progressed, in 39% (7/18) of those that regressed. HPV 16 was considered possibly causal in 67% (10/15) of the cases that persisted or progressed and in 10% (1/10) that regressed ($p=0.01$). *Conclusion:* Multiple HPV infections were frequently detected among women with CIN 2 at admission and during the follow up. The CIN 2 associated with HPV 16 were more likely to persist or to progress to CIN 3.

Key words: cervical intraepithelial neoplasia; HPV detection; HPV16; progression to CIN 3.

1. Introduction

Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer derive from cellular transformations of the cervix epithelium after HPV infection. High-risk HPV (HR-HPV) persistent infections represent a necessary cause of cervical cancer, but not sufficient (1). Additional conditions and events are required for the neoplastic transformation.

Firstly it was thought that cervical squamous cell carcinomas (SCC) would always evolve from HPV infected normal cervical epithelium via a continuum, long-lasting consecutive CIN 1, CIN 2 and CIN 3 lesions (1). However, it has been shown that clinically relevant CIN 2 or CIN 3 may be induced within 2-3 years following HPV high risk infection, and another 10-12 years may pass until invasive cervical carcinoma would develop (2). Most CIN 1 lesions that are associated with HR- HPV, and some CIN 2 lesions, should not be considered as true precursor stages of cervical cancer, but rather the cytopatic effect of a productive viral infection (3). Moreover, CIN 1 regression rate is high (4), as is the regression rate of CIN 2 (5-7), and both display viral expression patterns suggestive of productive viral infections. In contrast, some CIN 2 lesions and CIN 3 lesions show different viral gene expression, leading to atypical proliferation and cell transformation.. The development of CIN 3 arises in women who cannot resolve the HPV infection, and therefore the infections can persist for years or decades following initial exposure (8).

CIN 2 thus is a borderline lesion and can show clinical behavior similar to CIN 1 or to CIN 3. Since CIN 2 occurs frequently in young women (6), a more conservative therapeutic approach may be considered. For this reason, the 2006 consensus of the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP) (9) recommends that adolescents and young women with CIN 2 confirmed by biopsy and satisfactory colposcopy can have, rather than

immediate treatment, expectant management and follow-up every six months, with colposcopy and Pap testing, for a period of 24 months.

The pattern of HPV infection and re-infection in women and the outcome of CIN 2 is not well known. A better discrimination of CIN 2 trends to progression or regression could help in choosing the best clinical management. This study therefore aimed to describe the acquisition, persistence and clearance of HPV infection in women with CIN 2 confirmed by biopsy followed for 12 months under expectant management.

2. Materials and Methods

2.1. Study design and ethical methods

This cohort study was part of a research for evaluating expectant management of women with CIN 1 and CIN 2, carried out between January 2007 and December 2009 at the State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo State, Brazil. It was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medical Sciences of UNICAMP.

2.2. Selection and follow-up of the women studied

Women aged 18 to 46 years old were considered eligible for the study if they fulfilled the following criteria: 1) referral cervical smear showing atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) or low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); 2) biopsy showing CIN 2 reviewed by a senior pathologist (10); 3) lesion completely visualized by colposcopy and squamocolumnar junction totally visible; 4) not pregnant; 5) showing no evidence of any immunodeficiency diseases; 6) no history of previous invasive neoplasia; 7) HPV test result. The selection of patients was fully described in a previous publication (5). Fifty women consecutively fulfilled these criteria, agreed to participate in the study and signed the informed consent.

The planned follow-up was visits every three months during one year with cervical smear, colposcopy and sample collection for HPV detection. The women who showed a worsening of the suspicious image at colposcopy were submitted to biopsy. When the biopsy revealed CIN 2 or a less severe diagnosis, the woman was maintained in the follow-up plan. When the biopsy revealed CIN 3, immediate treatment by excision of the lesion was performed. At one year of follow-up, all the women who still showed cytological or colposcopy abnormalities were submitted to complete evaluation, and they were treated according to the final diagnosis. No ablative procedures were carried out.

During follow-up 13 women were discontinued due to: five women diagnosed with persistence in the intermediate controls did not show up for the final control; one woman tested positive for HIV; one woman missed three consecutive controls; one woman became pregnant; five women without at least one HPV test during follow up. After 12 month follow up, 37 women had final diagnosis established.

2.3. Outcome of CIN 2 follow-up

The final outcome of CIN 2 was classified as progression, persistence or regression, according to the following criteria:

- Progression: biopsy showing CIN 3 detected at any time during the follow-up. No lesion worse than CIN 3 was revealed.
- Persistence: biopsy showing CIN 1 or CIN 2 at twelve-month follow-up.
- Regression: negative cervical smear and colposcopy or negative biopsy observed at any time during the follow-up and confirmed at twelve-month follow-up.

2.4. Possible Causal HPV type

The HPV type possibly associated with the CIN 2 lesion was considered the possibly causal type. For the CIN 2 lesions that regressed, possibly causal HPV was considered when HPV type was detected at admission and persisted up to the follow-up visit immediately before the regression. If the lesion persisted, either as CIN 1 or CIN 2, possibly causal HPV was considered when detected at admission and during the follow-up visits. Among the cases that progressed, possibly causal HPV was considered when detected at admission and at least until the follow-up visit when progression was detected. The possibly causal HPV type was considered undefined if the test was negative at admission or if it was not possible to associate the HPV type with the CIN 2 lesion as described above.

2.5. Sample Processing and DNA Extraction

Aliquots of 200 µl of Universal Collection Medium UCM (QIAGEN Sample & Assay Technologies, QIAGEN Biotechnology Brazil Ltda) were taken for polymerase chain reaction (PCR) testing and were centrifuged for 10 minutes at 13,000g. The supernatants were immediately removed, and split cellular pellets stored at 80°C before nucleic acid extraction and HPV detection. The cellular pellets were resuspended in 200 µl of digestion solution (1mM Tris, 200 mg of proteinase K/ml, 0.5% sodium dodecyl sulfate) and digested at 55°C for 2 hours. The digestion was followed by 5-minute incubation at 95°C to inactivate the proteinase K. Nucleic acids were purified by phenolchloroform extraction followed by ethanol precipitation. The DNA pellet was dried and was dissolved in 100 µl of TE. Nucleic acids were stored at -80°C before HPV detection.

2.6. HPV genotyping

HPV amplification and genotyping was performed by the Roche Linear Array (LA) HPV genotyping test, according to manufacturer's instructions.

2.7. Data analysis

Tables were constructed showing the HPV type at admission and for every three month follow-up, grouped according to the clinical outcome. The association between two categorical variables was tested using Fisher's Exact Test. The cases with undefined HPV possibly causal type were not considered for the analysis.

3. Results

Table 1 shows the HPV detection at admission and every three months follow up visit. Women were grouped according to CIN 2 clinical outcome. Among the 37 women, 49% (18/37) regressed, 22% (8/37) persisted as CIN 1 or CIN 2 and 29% (11/37) progressed to CIN 3. There was no case of progression to invasive carcinoma detected during the study. At admission, 41% (15/37) had multiple HPV type detected and 11% (4/37) had negative HPV test. During follow-up, 54% (20/37) of women showed one or more new HPV type detected, resulting in eight more women with multiple HPV type detected.

Eighteen cases of CIN 2 regressed, of which 39% (7/18) had HPV 16 detected at admission, 16% (3/18) had HPV 56 and 16% (3/18) were HPV negative at admission. There were 33% (6/18) of the cases with multiple HPV types detected at admission and during follow up 61% (11/18) presented new HPV type detected, one case with three new HPV types and five cases with two new HPV types. The HPV test was negative at admission or at least at one visit during follow-up in 61% (11/18) of cases. The HPV 16 was considered

possibly causal in 6% (1/18) of cases. Considering the Alpha papillomavirus species, 28% (5/18) of cases were from group 9 and 6% (1/18) from group 7 (Table 1).

Eight cases persisted, four as CIN 1 and four as CIN 2. At admission, HPV 16 was detected in 50% (4/8) of the cases that persisted, HPV 58 in 38% (3/8) and HPV test was negative in one case. Multiple HPV types were detected in 38% (3/8) of the cases at admission and new HPV types were detected in 50 % (4/8). HPV 16 was considered possibly causal in 38% (3/8) of cases and HPV 58 in 38% (3/8). For all cases that the possibly causal HPV was suggested, they were from Alpha papillomavirus group, species 9 (Table 1).

Eleven cases (29%) progressed to CIN 3 up to twelve months follow-up. HPV 16 was detected at admission in 64% (7/11) of the cases, HPV 52 in 27% (3/11) and HPV 68 in 18% (2/11). Multiple HPV types were detected at admission in 54% (6/11) of cases and new HPV type was detected during follow-up in 45% (5/11). Among the cases that progressed there was no negative HPV test. HPV 16 was considered possibly causal type in 64% (7/11) of cases. For the cases that progressed, the possibly causal HPV type was from Alpha group, species 9 or 7 (Table 1).

Table 2 shows the association of HPV 16 with the CIN 2 clinical outcome. Cases that persisted as CIN 1 and CIN 2 were grouped together with the cases that progressed to CIN 3. HPV 16 was detected at admission in 58% (11/19) of the cases that persisted or progressed and in 39% (7/18) of the cases that regressed, but this difference was not statistically significant ($p=0.20$). HPV 16 was considered possibly causal in 67% (10/15) of the cases that progressed or persisted, and in 10% (1/10) of those that regressed, and the difference was statistically significant ($p=0.01$). The cases with undefined HPV possibly causal type were not considered for the latter analysis.

4. Comment

According to this cohort study, multiple HPV infections were frequently detected in women with CIN 2, as new HPV types were also frequently detected during twelve month follow up. The CIN 2 lesions associated with HPV 16 were more frequent among those lesions that progressed to CIN 3.

Cuschieri (11) showed that multiple high-risk HPV infections were prevalent in young women, in high and low grade cervical intraepithelial neoplasia, reflecting common sexual transmission of multiple high risk HPV. Sometimes the lesion became HPV negative and at the next visit new infections were acquired. In this scenario, most of the HPV infections are probably productive, as pointed by Snijders et al. (1), that is, transitory infections, not inducing transformation process in the host cell.

Castle et al (12) found that the presence of HPV 16 was positively associated with CIN 3 and they reported that CIN 2 caused by HPV-16 may be more likely to progress than CIN 2 caused by other high-risk HPV types (13). Wentzensen et al (14) also showed that CIN 2 related to HPV 16 was more likely to persist. The absolute risk of precancer diagnosis can approach 40% after 3-5 years of persistent HPV 16 infection (15). Kjær et al (16), in a population study, found that HPV 16 persistent infection was associated with high absolute risk for progression to high-grade cervical lesions.

The possible causal HPV type in all cases that persisted or progressed were from Alpha species 9 or 7. This is in accordance with previous studies showing that infections with HPV 16 and, secondarily, the other types in Alpha 9 and Alpha 7 species, are at higher risk of progression given persistence (17).

HPV infection can be considered productive when the expression of viral gene products remains regulated, not leading to significant host cell changes. Transformation

infections arise where the productive infection cannot be properly supported due to increased activity of viral protein E6 and E7, which leads to genomic instability in the infected cell, accumulation of oncogene mutations, further loss of cell-growth control, and ultimately precancer lesions and cancer (8,18).

There was no negative HPV test in those cases that progressed, regardless of the HPV type. Among the eight cases that persisted, three cases presented negative HPV during follow-up, but two cases the lesion persisted as CIN 1. Among the 18 cases that regressed, 11 presented negative HPV during follow-up, indicating transient infections.

The regression rate found is not different from the reported regression rate of CIN 2 in adult women, that ranges from 15 to 55% regression over 4-6 years of follow-up (13,19). Moscicki et al. reported CIN 2 regression rate of almost 70% among adolescents and young women, and progression rate of 15% at three years (7). This greater regression rate might be due to the younger age of the women studied (13 to 24 years old), that could reflect a shorter time of HPV persistent infection, and to the longer follow-up of three years. In the present study, the women's age was not used to select the population and the follow-up was twelve months, and the progression rate was similar to others that showed greater risk of CIN 2 progression when the lesion was associated with HPV 16 infection (14,17).

This study has limitations due to small sample subject. The inclusion criteria were women with cervical smear referral showing ASCUS or LSIL, CIN 2 proven biopsy, HPV test at admission and at least at one follow-up visit, which limited the number of selected women. Besides, multiple HPV infections were frequent in these women and, therefore, the indication of possibly casual HPV type for the CIN 2 was not always obvious.

For clinical practice, the findings of this study suggest that the HR-HPV testing would have limited utility to indicate those women with greater risk of CIN 2 progression since the

rate of HR-HPV positive was high among women with CIN 2 regression. Nevertheless, expectant management, which may be proposed for young women, should be considered cautiously when HPV 16 infection is detected. In conclusion, infections with multiple HPV types were frequently detected at admission and follow-up visits as well as infections with new HPV types during follow-up. CIN 2 lesions with HPV 16 alone or in combination with other HR-HPV types are more prone to progression to CIN3.

Conflict of interests

These authors declare no competing interests.

Aknowledegments

This study was supported by a grant from FAPESP, grant number 2010/07880-8

References

- 1) Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implication. *J Pathol* 2006; 208:152-64.
- 2) Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM et al. Development and duration of human papillomavirus lesions after initial infection. *J Infect Dis* 2005; 191:731-738.
- 3) Cox JT, Schiffman M, Solomon D, ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 2003Jun;188(6): 1406-12.
- 4) Laurie Elit, Mark N, Levine, Jim A, Julian M, Math, John W. Sellors, Alice Lytwyn, Sylvia Chong, James B. Mahony, ChuShu Gu, Terri Finch, and Zeferino LC. Expectant Management Versus Immediate Treatment for Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Randomized Trial in Canada and Brazil. *Cancer* 2011 Apr1;117(7):1438-45
- 5) Discacciati MG, de Souza CA, D'Ottaviano MGL, Angelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol* 2011 Apr;155(2):204-8.
- 6) Moscicki AB, Shiboski S, Hill NK, Powell K, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton LK, Farhat S, Broering JM, Darragh TM. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004;364:1678-83.

- 7) Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shiboski S. Rate of risks for Regression of CIN 2 adolescents and young women. *Obstet Gynecol* 2010 Dec;116(6):1373-1380.
- 8) Doobar J, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* 2006;110,525-541.
- 9) Wrigth Jr TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:340-5.
- 10) Scully RM, Bonfiglio TA, Kurman RI, Silverberg SG, Wilkins EJ. Histological typing of female genital tract tumors – World Health Organization-International histological classification of tumors, 2nd ed., Berlin:Spring-Verlag 1994;36-49.
- 11) Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C, Gilkisson G, McGoogan E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening. *J Clin Pathol* 2004 Jan;57(1):68-72.
- 12) Castle PE, Stoler MH, Solomon D, Schiffman M. The relationship of community biopsy-diagnosed cervical intraepithelial neoplasia grade 2 to the quality control pathology-reviewed diagnoses; an ALTS^report. *Am J CLin Pthol* 2007 May; 127(5):805-15.
- 13) Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Obstet Gynecol* 2009 Jan;113(1):18-25.
- 14) Wentzensen N, Walker J, Schiffman M, Yang HP, Zuna RE, Dunn ST, Allen RA, Zhang R, Sherman M, Gold MA, Wang SS. Heterogeneity of high-grade cervical intraepithelial

neoplasia related to HPV16: Implications for natural history and management. *Int J Cancer* 2012;Apr5.doi:10.1002/ijc.27577. [Epub ahead of print]

- 15) Schiffman M, Castle EC, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
- 16) Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Ifner T. Long – term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst* 2012 Oct 6;102(19)1478-88.
- 17) Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC D, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337:76-84.
- 18) Doobar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;325:7-15.
- 19) Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infectious Diseases* 2009;9:119.

Table 1 - Distribution of HPV types at admission and every three months of follow-up according to clinical outcome of women with CIN 2

Clinical Outcome	Admission	Follow-up visit (month)				Possibly causal HPV	Alpha Papilloma virus sp
		3rd	6th	9th	12th		
Regression at 3rd	71	71, <u>58</u>	Na	Neg	<u>16</u>	Undefined	-
Regression at 6th	16,58	16	16	16	Na	58	9
	51	51	Neg	Neg	Neg	51	5
	26	Na	Neg	Na	<u>16</u>	26	5
	39,52,54,56,68	39,52,68	52, <u>51</u>	<u>58</u>	Na	39	7
	16	16	16	16	16	Undefined	-
	31	31	31	31	Neg	Undefined	-
	Neg	Neg	Neg	Neg	<u>16</u>	Undefined	-
	16,56,66	56, <u>33</u>	Na	33	Na	56	6
	Neg	<u>16</u>	<u>58</u>	Neg	Na	Undefined	-
	31	Na	<u>61</u>	Na	Na	Undefined	-
Regression at 9th	33	33, <u>16,58</u>	33	Neg	Neg	33	9
	16,67	Na	67	Neg	16	67	9
	16	16, <u>39</u>	Neg	Neg	Neg	16	9
	6,16,33	33	Neg	Neg	Neg	33	9
	39,51,53,56	Na	39,51	53, <u>18</u>	39, <u>59</u>	51	5
Regression at 12th	Neg	Na	Neg	Na	<u>16,58,59</u>	Undefined	-
	16	16	Na	Na	16	Undefined	9
Persistence as CIN 1	16	16	Na	16, <u>61,81</u>	16,61,81	16	9
	Neg	Neg	<u>53</u>	53	53, <u>16,42</u>	Undefined	-
	16	16	16	Neg	Na	Undefined	-
	81	<u>51</u>	81	<u>16</u>	Na	Undefined	-
Persistence as CIN 2	33	Na	Na	Na	33	33	9
	16,58	16,58	16,58	16,58	16,58	16 or 58	9
	16,58	16,58	16,58	16,58	Na	16 or 58	9
	35,58,73	<u>Neg</u>	35,58, <u>62</u>	35,58, <u>16</u>	Na	35 or 58	-
Progression at 6th	16	16	16	16	Na	16	9
	16	16	16	16, <u>66</u>	16,66	16	9
	16,33,68	16,33,68	16,33	16,33	16,33,68	16 or 33	9
Progression at 9th	16,68,84	16,84, <u>42,58</u>	16, 68,58	16,68,58	16, <u>18</u>	16	9
Progression at 12th	39	39	39	39	39	39	7
	16,51,52,53	16,52, <u>45,84</u>	16,52,84	16,52, <u>58</u>	16,52	16 or 52	9
	16,52	Na	Na	16,52	16,52	16 or 52	9
	52,82	52,82	52	Na	52	52	9
	6	6, <u>39</u>	39	Na	Na	Undefined	-
	31	31	31	Na	Na	31	9
	16,56	16,56, <u>73</u>	16,56,73	Na	Na	16 or 56	9 or 6

New HPV types detected during follow up are underlined

Table 2 - Association between HPV 16 at admission and as possibly causal type and clinical outcome of CIN 2 during 12 months of follow-up

HPV 16	Progression/persistence		Regression		p value
	n	%	n	%	
At admission					
Yes	11	58	7	39	p= 0.20
No	8	42	11	61	
Total	19	100	18	100	
Possibly causal					
Yes	10	67	1	10	p=0.01
No	5	33	9	90	
Total	15 ¹	100	10 ²	100	

1-four cases with undefined causal HPV

2- eight cases with undefined causal HPV

4.2. Artigo 2

Detection of HPV DNA 16 integration in CIN 2 followed up for 12 month: a case series

Maria Gabriela Loffredo D’Otaviano^a, Lara Termini^b, Andréa Trevisan^b, Silvia H. Rabelo-Santos^c, Luisa Lina Villa^b, Luiz Carlos Zeferino^a

a- Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

b- Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo; HPV Institute (INCT-HPV), School of Medicine, Santa Casa, São Paulo, SP, Brazil

c- School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Corresponding author:

Luiz Carlos Zeferino

Rua Alexander Fleming, 101

Cidade Universitária Zeferino Vaz

13083-881 Campinas, SP, Brazil

Tel: -55-(19)35219466

e-mail: zeferino@fcm.unicamp.br

Abstract

Background: Integration of HPV DNA 16 has been considered a key step for the progression of persistent HPV infection to invasive cervical cancer. *Objective:* To describe the HPV DNA 16 physical status in women with CIN 2 follow up for 12 month and to verify its association with clinical outcomes. *Study Design:* The study included 20 women with CIN 2 proven biopsy, and evaluation of HPV DNA 16 physical status at admission. They were followed up every three months for one year with cervical smear, colposcopy and HPV DNA 16 physical status. Real-time PCR assay for HPV 16 E6 and E2 viral loads were performed to assess HPV DNA 16 physical status. *Results:* At admission, five cases (25%) showed integrated HPV DNA 16 and 15 cases (75%) episomal form. The women with integrated HPV DNA 16 were 8.3 years older than those with episomal form ($p=0.07$). HPV 16 was detected as multiple infections in 70% (14/20) of the cases. The integration of HPV DNA 16 was detected at least in one visit in 37% of CIN 2 that regressed, 60% that persisted, and in 100% that progressed to CIN 3 ($p=0.03$). *Conclusions:* This study, although limited by the small number of cases, showed that HPV DNA 16 integration is associated with CIN 2 persistence and progression to CIN 3.

Background

Human papillomavirus (HPV) infection is the major risk for the development of cervical cancer. High risk HPV (HR-HPV) is found in more than 90% of cervical cancers. HPV 16 and HPV 18 are the most common types associated with preneoplastic lesions and carcinoma¹⁻². It is known that persistent infection with HR- HPV types, although necessary, is not sufficient for the pathogenesis of cervical cancer. At least 80% of infections are transient, not leading to cervical lesions³.

Integration of HPV DNA is considered an important step in the progression of persistent HR-HPV infection to invasive cancer⁴. The integration of viral DNA into the cellular genome usually disrupts the E1 and E2 open reading frames. The disruption of the E2 gene results in lack of expression of E2 protein and up-regulation of the E6 and E7 proteins. The over expression of E6 and E7 is associated with transformation and immortalization on infected cells⁵. Consequently, HPV DNA 16 integration provides a selective growth advantage in the infected cells and is associated with treatment failure or shortened disease-free survival⁶. These cell clones with integrated viral genome copies in pre neoplastic lesions may have a higher risk of progression to invasive carcinoma⁷⁻⁸.

Integration of viral genome copies therefore contributes to the neoplastic transformation process. However, the absence of HPV DNA integration in some carcinomas implies that integration is not always required for malignant progression⁷⁻⁹. The integration of HPV DNA 16 can be found in the very early stages of cervical neoplastic progression, and the mixed form is detectable in cervical smears with normal morphology¹⁰. A question of concern is to what extent the integration is a cause or a consequence of chromosomal instability induced by deregulated HR-HPV E6 and E7 oncogenes expression⁷.

The CIN 2 is a heterogeneous preneoplastic lesion and might have a biological behavior closer to CIN 1 than to CIN 3¹¹⁻¹², despite the fact that it has been classified as high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) for cytological smears results¹³. The CIN 2 occurs frequently among adolescents and young women, and the regression rates of these lesions is high¹¹. Therefore, a more conservative clinical approach has been proposed for these women¹⁴⁻¹⁵.

Considering that the integration of HPV DNA 16 is related to neoplastic progression, the present study aimed to describe the HPV 16 physical status in women with CIN 2 followed for 12 month and verify its association with clinical outcome. This knowledge can better characterize the biological behavior of the CIN 2.

2. Study design

2.1. Patient selection

This cohort study was part of a research for evaluating expectant management of women with CIN 1 and CIN 2, carried out between January 2007 and December 2009 at the State University of Campinas (UNICAMP), São Paulo State, Brazil. It was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medical Sciences of UNICAMP.

Women were considered eligible for the study if they fulfilled the following criteria: 1) cervical referral smear showing atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) or low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); 2) biopsy showing CIN 2, reviewed by a senior pathologist; 3) lesion completely visualized by colposcopy and squamocolumnar junction totally visible; 4) not pregnant; 5) showing no evidence of any immunodeficiency diseases; 6) no history of previous neoplasms.

Fifty women fulfilled these criteria, agreed to participate in the study and signed the informed consent. Among these women, 20 tested positive for HPV 16 at admission and had at least one other visit with HPV result. These women were followed during one year with cervical smear, colposcopy, and HPV DNA 16 physical status every three months. The women who showed a worsening of the suspicious image at colposcopy in relation to the previous examination were submitted to biopsy. When the biopsy revealed CIN 2 or a less severe diagnosis, the woman was maintained in the follow-up plan. When the biopsy revealed CIN 3, immediate treatment by excision of the lesion was performed. At one year of follow-up, all the women who still showed cytological or colposcopy abnormalities were submitted to a complete evaluation, and they were treated according to the final diagnosis. No ablative procedures were carried out.

2.2. Sample Processing and DNA Extraction

Aliquots of 200 ml of Universal Collection Medium (UCM - QIAGEN Sample & Assay Technologies, QIAGEN Biotechnology Brazil Ltda) were taken for polymerase chain reaction (PCR) testing and were centrifuged for 10 minutes at 13,000 g. The supernatants were immediately removed and split cellular pellets stored at 80°C before nucleic acid extraction and HPV detection. The cellular pellets were resuspended in 200 ml of digestion solution (1mM Tris, 200mg of proteinase K/ml, 0.5% sodium dodecyl sulfate) and digested at 55°C for 2 hours. The digestion was followed by 5-minute incubation at 95°C to inactivate the proteinase K. Nucleic acids were purified by phenolchloroform extraction followed by ethanol precipitation. The DNA pellet was dried and was dissolved in 100 µl of TE. Nucleic acids were stored at 80°C before HPV detection.

2.3. HPV genotyping

HPV amplification and genotyping was performed by the Roche Linear Array (LA) HPV genotyping test. HPV DNA was amplified with the L1 consensus biotin-labeled PGMY09/PGMY11 primer set in a thermal cycler at 95°C for 13 min, followed by denaturation for 1 min at 95°C, annealing for 1 min at 55°C, and extension at 72°C for 1 min, for a total of 40 cycles. Amplification was followed by a 5-minute terminal extension step at 72°C. Biotin-labeled GH20 and PC04 primers to the β -globin gene were used as amplification control. HPV genotyping was performed with a reverse line blot detection system: PCR products were denatured in 1.6% NaOH and hybridized to an immobilized probe array containing probes for β -globin at 2 concentrations, 19 HR-HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 and 82) and 18 LR-HPV (6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 72, 81, 83, 84, IS39 and CP6108) genotype probes. Positive hybridization was detected by streptavidin-horseradish peroxidase-mediated color precipitation on the membrane at the probe line.

2.4. HPV-DNA 16 Integration

Real-time PCR was performed with the ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). The amplification conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and a two-step cycle of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s, for a total of 40 cycles. The primers and probe were designed with the aid of the Primer Express program, 1.0b6 (PE Applied Biosystems), for specific amplification of the E2 and E6 ORFs in this study. The sizes of the E2 and E6 amplicons were 76 and 81 bp, respectively. The E6 probe was labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end, and Dark Quencher (Scandinavian Gene Synthesis AB, Koping, Sweden) at the 3' end. The E2 probe was labeled with BODIPY R6G (the BODIPY dyes used are under license to Scandinavian Gene Synthesis from Molecular Probes Inc.) at the 5' end, and Dark

Quencher at the 3' end. The final primer and probe concentrations, in a total volume of 50 μ l, were 0.3 and 0.1 M, respectively. Fifty nanograms of target DNA from biopsy specimens was added to the reaction mixture. Two standard curves were obtained by amplification of a dilution series of 50 million to 500 copies of a clone of HPV16 in pBR322.

2.5. Outcome of CIN 2 follow-up

The final outcome of CIN 2 was classified as progression, persistence or regression according to the following criteria:

- Progression: biopsy showing CIN 3 detected at any time during the follow-up. No lesion worse than CIN 3 was revealed.
- Persistence: biopsy showing CIN 1 or CIN 2 at the twelve month follow-up.
- Regression: negative cervical smear and colposcopy or negative biopsy observed at any time during the follow-up and confirmed at twelve-month follow-up.

3. Statistical Analysis

A descriptive table was constructed to show all cases included in this analysis presenting the HPV type at admission, HPV DNA 16 physical status and the clinical outcome every three month visit. Mann-Whitney test was used to compare the age of the women with episomal and integrated HPV DNA 16. The Chi-square test for linear trends (extended Mantel-Haenszel) was used to assess association between HPV DNA 16 integration with regression, persistence and progression of CIN 2.

4. Results

At admission, five cases showed the integrated form of HPV-DNA 16 and 15 cases showed the episomal form. The mean age of the first group was 32.8 years old and of the latter was 24.5 years old, showing that women with HPV DNA 16 integrated were 8.3 years older than those with episomal form at admission. The Mann-Whitney test showed p value = 0.07 for assessment of the age distribution of the women with episomal and integrated HPV DNA 16 (data not shown). Table 1 shows the clinical outcome and HPV DNA 16 physical status of CIN 2. At admission, HPV 16 was associated with others HPV types in 70% (14/20) of the cases. Forty percent (8/20) of the cases regressed at twelve month follow-up and 60% (12/20) persisted or progressed to CIN 3. Five cases (25%) showed HPV DNA 16 integrated at admission, three maintained the physical status, and two changed to the episomal form at the subsequent follow-up visits. These five CIN 2 cases persisted or progressed to CIN 3 up to 12 month follow-up. Regarding the 15 cases with episomal form at admission, 7 cases (46%) persisted or progressed to CIN 3, and 8 (54%) cases regressed up to 12 month follow-up. All CIN 2 cases that progressed to CIN 3 showed integrated HPV DNA 16 either at admission or during follow-up.

The integration of HPV DNA 16 was detected at least in one visit in 37% (3/8) of CIN 2 that regressed, 60% (3/5) that persisted, and 100% (7/7) that progressed to CIN 3 (Table2). According to Chi-square for Linear Trends (extended Mantel-Haenszel) the trend observed of HPV DNA 16 integration, from regression to persistence and progression, was statistically significant ($p=0.03$).

5. Discussion

The results of this study suggested that HPV DNA 16 integration is an important event for CIN 2 progression to CIN 3. Nevertheless, HPV DNA 16 integration could be

detected among the CIN 2 cases that regressed after 12 month follow up. The integration of HPV DNA 16 was detected in 37% of CIN 2 that regressed, 60% that persisted, and 100% that progressed to CIN 3, and this trend was statistically significant, in despite of the small sample size. These findings shall be pointed out because only strong association can be demonstrated in small sample size.

The integration of HPV DNA has been reported as a key step in neoplastic transformation, but the integrated form of HPV DNA 16 was described in normal cervix epithelium and CIN 1¹⁰ and the episomal form has also been detected in squamous cervical carcinoma (SCC). Cricca et al.¹⁶ found a significant association between the HPV 16 physical status and the lesion grades: CIN 1 showed 72.2% of the episomal form, and 27.7% of the mixed form; CIN 2 and CIN 3 showed 20.5% of the pure episomal form, 73.5% of the mixed form and 6.0% of integrated form; SCC showed 81.8% of the integrated form. Guo et al.¹⁷ observed 35% of HPV DNA 16 integration in carcinoma and 14% in CIN 2 and CIN 3. Azizi et al.¹⁸ found different results, i.e. the presence of the HPV 16 integrated form was not associated with CIN 2 and CIN 3; they found that the HPV 16 E2 polymorphism influenced the quantification of episomal and integrated HPV 16.

The variation of HPV DNA 16 integration rates found among studies might be due to the different primers targeting different E1 or E2 regions, the polymorphism of E2 and the effect of the adjacent tissue around the target lesion¹⁸⁻¹⁹. In addition, there is a wide range of study designs, samples and specimens²⁰⁻²¹⁻²². Even though the rate of integrated versus episomal form presents variation between studies, there is a consensus that the integrated form is more prevalent in more severe lesions.

Previous publication of the clinical outcome of these women showed low rates of persistence or progression (26%), regardless the HPV infection, which was explained by the

selection criteria; the inclusion of women with previous LSIL could have selected less severe CIN 2, those showing behavior similar to CIN 1^{11,23}. The current study included only women with HPV 16 who showed 60% of persistence or progression to CIN 3; all the cases that progressed to CIN 3 showed HPV DNA 16 integration at some moment from admission to 12 month follow-up.

The limitation of this study was the very small sample size that restricted the analysis due to the low statistical power; in such condition only the strong association between the variables can be demonstrated, as it was for the HPV DNA 16 integration and CIN 2 clinical outcome.

A better understanding of the biological behavior of CIN 2 associated with HPV 16 physical status could qualify the knowledge of cervical carcinogenesis. The present study showed that HPV-DNA 16 integration is associated with CIN 2 progression to CIN 3.

Funding

This study was supported by FAPESP, grant number 2010/07880-8.

Competing interests

None declared.

Ethical approval

The protocol was approved by the medical ethical committee of the Faculty of Medical Sciences of UNICAMP.

References

- 1) Clifford, GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S, Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer, 2003 jan 13; 88(1): 63-73.
- 2) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et l. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003;348:518-27.
- 3) Schiffman M, Castle EC, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 2007;370:890-907.
- 4) Hopman AHN, Smedts F, Dignef W, Ummulen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJM, Ramaekers FCS. Transition to high grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. J Pathol 2004 Jan;202(1):23-33.
- 5) Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res 2003;89:213-228.
- 6) Jeon S, Allen-Hoffman BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with selective growth advantage of cells. J Virol 1995; 69:2989-2997.
- 7) Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus Klaes R, Driesch C. Melsheimer P, Kisseljov F, Durst M, Scheider A, Doeberitz M. von K. Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. Cancer Res, 2008;68: (1)

- 8) Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis J. Clin Pathol, 2008; May:61(5):627-31.
- 9) Arias-Pulido H, Cheri L. Peyton, Nancy E, Joste, Hernan Vargas, Cosette M. Wheeler. Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma. In: Situ and in Invasive Cervical Cancer J Clin Microbiology, May 2006, p. 1755–1762 Vol. 44, No.5.
- 10) Kulamala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P, Syrjanen KJ, Johansson BC. Early integration of high copy HPV 16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. J Clin Pathol, 2006 May: 59(5): 513-7.
- 11) Discacciati MG, de Souza CA, D'Ottaviano MGL, Angelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. Eur J Obstet Gynecol .2011 Apr;155(2):204-8.
- 12) Monteiro DLM, Trajano AJB, Russomano FB, Silva, KS. Prognosis of intraepithelial Cervical Lesion During Adolescence in up to two years of follow-up. J Pediatr Adolesc Gynecol 2010; n.23: 230-236.
- 13) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriaty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wrigth T Jr, Young N. Forum Group Members. Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002; 24;287:2114-9.
- 14) Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S, Shibosk S. Rate of and risks for Regression of CIN 2 in adolescents and young women. Obst Gynecol, 2010 December; 116(6):1373-1380.

- 15) Wright, TC, Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Oct; 197(4): 340-5.
- 16) Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Viral. DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV 16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2007 Sep;106(3):549-5
- 17) Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, COgdell DE, Lin E, Luthra R, Zhang E. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Modern Pathology* 2007;20:256-266.
- 18) Azizi N, Brazete J, Hankins C, Money D, Fontaine J, Koushik A, Rachils A, Pourreaux K, Frenczy A, Franco E, and François Coutlée for the Canadian Women's HIV Study Group. Influence of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*. 2008 Jul;89(Pt 7):1716-28
- 19) Wanram S, Limppaiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V, Jearanaikoon P. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Am J Obst & Gynecol*, (7), 2009, 79e1-79e7.

- 20) Saunier M, Monnnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolt J, Riethmuller D, Kantelip B, Schwartz E, Mougin C, Prétet J-L. Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA load and Physical State for Identification of HPV 16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol* 2008 Nov;3678-3685.
- 21) Nambaru L, Meenakumari B, Swaminathan R, Rajkumar. t. Prognostic Significance of HPV Physical Status and Integration Sites in Cervical Cancer. *Asian Pacific J of Cancer Prev*,2009;10:355-360.
- 22) Ramanakumar A, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Frenczy A, Coutlée C, Franco EL. Human papillomavirus (HPV) types 16,18,31,45, DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infectious Diseases*, 2012, 10:326.
- 23) Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Jl of Pathology* 2006; 208:152-64

Tabela 1: CIN 2 Clinical outcome and HPV 16 physical status

HPV type	HPV 16 physical status at admission	3 months		6 months		9 months		12 months	
		Physical status	Clinical outcome	Physical status	Clinical outcome	Physical status	Clinical outcome	Physical status	Clinical outcome
16	Integr	Integr	Persist	Integr	Persist	na	Persist	Integr	Progress
16,33,68	Integr	Epis	Persist	Integr	Persist	Epis	Persist	Epis	Progress
16,58	Integr	Integr	Persist	Integr	Persist	Integr	Persist	Integr	Persist
16,51,52,53	Integr	Integr	Persist	na	Persist	Epis	Persist	Integr	Progress
16,52	Integr	na	na	na	na	na	Progress	Integr	Progress
16	Epis	Epis	Persist	Integr	Progress	na	Progress	na	Progress
16,56	Epis	Epis	Persist	Integr	Persist	na	Persist	na	Progress
16,68,84	Epis	Epis	Persist	Integr	Persist	Epis	Progress	na	Progress
16	Epis	Epis	Persist	Integr	Persist	na	Persist	na	Persist
16,33	Epis	Epis	Persist	Integr	Persist	na	Persist	na	Persist
16,58	Epis	Epis	Persist	Epis	Persist	Epis	Persist	na	Persist
16,33,52	Epis	na	na	na	Persist	na	Persist	na	Persist
16,58	Epis	Epis	Persist	Integr	Regress	na	Regress	na	Regress
16,58	Epis	Epis	Persist	Integr	Regress	na	Regress	na	Regress
16	Epis	Epis	Persist	na	Persist	na	Persist	na	Regress
16	Epis	na	Persist	na	Regress	na	Regress	na	Regress
16,6,33	Epis	na	Regress	na	Regress	na	Regress	na	Regress
16	Epis	Integr	Regress	Epis	Regress	Epis	Regress	Integr	Regress
16,67	Epis	na	Persist	na	Persist	na	Regress	Epis	Regress
16,56,66	Epis	na	Regress	na	Regress	na	Regress	na	Regress
Epis- episomal		Integr-integrated		Na- not available					

Tabela 2: HPV 16 integration and CIN 2 clinical outcome at 12 month follow-up

HPV 16 integration	12-month outcome						Chi-square test
	Regression		Persistence		Progression		
	n	%	n	%	n	%	
Yes	3	(37)	3	(60)	7	(100)	p=0,03
No	5	(64)	2	(40)			
Total	8	(100)	5	(100)	7	(100)	

5. Discussão

Com base nos resultados deste estudo, as mulheres que desenvolvem NIC 2 frequentemente apresentam infecção múltipla por HPV, sendo que para a maioria dos casos apenas um tipo de HPV é identificado como possível causador da lesão. Na admissão, 41% das mulheres apresentaram dois ou mais tipos de HPV e 54% delas infecção por novos tipos de HPV ao longo do seguimento de 12 meses. Crum et al (41) também identificaram infecções por vários tipos de HPV em pacientes com NIC 2 ou NIC 3 em 22% dos casos na admissão e nova infecção por HPV em 37% dos casos após seis meses de seguimento. Outro estudo com mulheres submetidas ao rastreamento do câncer do colo do útero mostrou infecção por múltiplos tipos de HPV em 43% dos casos, principalmente entre mulheres jovens, sendo que HPV de alto risco foi detectado nas lesões intraepiteliais de baixo e de alto graus, refletindo a alta taxa de transmissão sexual do HPV de alto risco (42).

Ainda de acordo com os resultados deste estudo, a NIC 2, quando possivelmente associada à presença do HPV 16, tem maior chance de persistir

ou progredir para NIC 3. Quando o HPV 16 foi considerado provavelmente causal, 67% das NIC 2 persistiram ou progrediram e apenas 21% das NIC 2 regrediram.

É bem conhecido o risco conferido pela infecção do HPV 16 para a neoplasia do colo do útero (21,43). Em estudo populacional com mulheres apresentando achados citológicos normais na admissão e com HPV 16 detectado em um controle, a probabilidade estimada de desenvolver NIC 3 em 12 anos foi de 26,7%, e quando o HPV 16 foi detectado na admissão e dois anos após, a probabilidade de desenvolver NIC 3 foi de 47,4% (20). Outro estudo semelhante observou uma incidência de 17% de NIC 3 após 10 anos de seguimento em mulheres inicialmente sem lesão, mas infectadas pelo HPV 16 (19). A persistência do HPV 16 por 12 meses mostrou o risco de 21% de diagnóstico de NIC 2 ou NIC 3 (44), e a persistência por 5 anos um risco de 20% de NIC 3 ou carcinoma invasor (45).

Estes resultados sugerem que o teste de detecção de HPV de alto risco teria aplicação limitada na prática clínica para o seguimento das mulheres com NIC 2 sem tratamento, devido à alta prevalência de infecções múltiplas por HPV de alto risco. Mesmo que a infecção pelo HPV possivelmente causal e a NIC 2 regredam, o teste pode continuar positivo devido às infecções associadas. Nestas condições o teste de detecção de HPV de alto risco poderia contribuir apenas quando o resultado fosse negativo. Por outro lado, a identificação do HPV tipo 16 poderia selecionar as mulheres com maior risco de progressão.

A integração do HPV DNA 16 no genoma da célula hospedeira é considerada um passo importante na transformação neoplásica. A presença do

HPV DNA 16 integrado está associada com a severidade da lesão (24), sendo as formas integradas e mistas mais prevalentes entre as lesões mais graves. Porém, a ausência da forma integrada em alguns cânceres invasivos e a presença da forma integrada em lesões de baixo grau, ou até mesmo em cérvices normais, sugere que a integração não é uma condição necessária para a progressão da lesão. Ainda, discute-se se a integração do HPV DNA 16 seria a causa ou a consequência da instabilidade cromossômica na célula hospedeira, levando ao processo neoplásico (29).

Este estudo mostrou que não houve progressão da NIC 2 para NIC 3 sem a integração do HPV DNA 16 na admissão ou durante o seguimento de 12 meses. Entretanto, foi detectada a integração do HPV DNA 16 durante o seguimento entre os casos de NIC 2 que regrediram. Além disso, observou-se que o HPV DNA 16 variou entre episomal e integrado, e vice-versa ao longo dos 12 meses de seguimento, sugerindo que poderia haver reversibilidade da forma integrada para episomal.

As mulheres incluídas no presente estudo apresentavam exame citológico inicial com resultado de LSIL ou ASC-US, o que pode ter selecionado os casos de NIC 2 de menor gravidade (33). O tamanho amostral foi pequeno e, portanto, de baixo poder estatístico para demonstrar diferenças pequenas, mas reais. Portanto, somente as diferenças ou associações mais evidentes foram demonstradas – como seria a associação da detecção do HPV 16 como possível causal e a integração do HPV DNA 16 – com a persistência e progressão da NIC 2.

Considerando que a infecção pelo HPV 16 é um potencial fator de risco para a progressão das lesões precursoras do câncer do colo uterino, as sociedades americanas chegaram ao consenso de que devem ser referidas para avaliação colposcópica as mulheres com infecção pelo HPV 16, mesmo sem lesão, porém não as que apresentarem infecção por outros tipos de HPV (46).

Concluindo, a infecção por múltiplos tipos de HPV é frequente nas mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2, assim como a infecção por outros tipos de HPV durante o seguimento de 12 meses. As NIC 2 associadas à detecção do HPV 16 persistem ou progridem com maior frequência. As NIC 2 que progrediram para NIC 3 apresentaram o HPV DNA 16 na forma integrada na admissão ou em algum momento do seguimento.

6. Conclusões

- Na admissão, 41% dos casos de NIC 2 apresentaram infecção por múltiplos tipos HPV e durante o seguimento em 54% dos casos foram identificados novos tipos de HPV. A aquisição e a resolução de infecção pelo HPV são eventos frequentes.
- As NIC 2 associadas à infecção pelo HPV 16 têm maior chance de persistir ou progredir para NIC 3.
- O HPV DNA 16 na forma integrada foi detectado em 25% dos casos e na forma episomal em 75% dos casos na admissão. No seguimento de 12 meses houve variação da forma integrada do HPV DNA 16 para forma episomal e vice-versa.
- As NIC 2 associadas à integração do HPV DNA 16 têm maior chance de persistir ou progredir para NIC3.

7. Referências Bibliográficas

1. WHO. World Health Organization - <http://www.who.int/en.>, (acessado em agosto de 2012).
2. INCA. Instituto Nacional de Câncer – <http://www2.inca.gov.br>. (acessado em agosto de 2012).
3. Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJLM. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implication. *J Pathol* 2006; 208:152-64.
4. Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Research*. 2002; 89:183-90
5. Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. *Acta Biochimica Polonica*. 2008;55(4):687-92.
6. Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigão PH, Xavier MP, Silva K, Botelho MO et al. Human Papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005;9:398-404.
7. De Villers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: 17-27.

8. Munoz N, Bosch FX, de Sajosé S, Herrero R, CAstellsagué X, Shan KV et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiology classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518-27.
9. Doobar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006;110, 525-41.
10. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U et al. Over expression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001; Apr 15; 92(2):276-84.
11. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004; 64:3878-84.
12. Munoz N, Castellsangué X, de Gonzáles AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; S3/1-S3/10.
13. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infection. *J Clin Virol*. 2005;32 (Supl1); S16-S24.
14. Schiffman M, Castle EC, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007; 370:890-907.
15. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen A, Peto J et al.. The IBSCC study group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Int*. 1995; 87:796-802.
16. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*.1999;189:12–9.

17. Munoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004;111:278–85.
18. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta analysis. *Br J Cancer*. 2003;88:63–73.
19. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jul 9;97(14): 1072-9.
20. Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst*. 2010; Oct 6;102(19) 1478-88.
21. Wentzensen N, Walker J, Schiffman M, Yang HP, Zuna RE, Dunn ST et al. Heterogeneity of high-grade cervical intraepithelial neoplasia related to HPV16: Implications for natural history and management. *Int J Cancer*. 2012; Apr 5.
22. Peitsaro B, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(3):886-91.
23. Wanram S, Limppaiboon T, Leelayuwat C, Yuenyao P, Guiney DG, Lulitanond V et al., The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Am J Obst & Gynecol*. 2009; 79(7): 79 e1-79 e7.
24. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV 16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*. 2007;106: 549-57.

25. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004; 92(3):873-80.
26. Huang LW, Chao SL, Lee BH. Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis *J Clin Pathol.* 2008; 61(5):627-31.
27. Kulamala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, Shabalova IP, Petrovichev N, Tosi P et al. Early integration of high copy HPV 16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol.* 2006; 59(5): 513-7.
28. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infectious Diseases.* 2009, 9(119):1-26.
29. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F et al. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008; 68: 307-13.
30. Saunier M, Monnnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolt J, Riethmuller D et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for Identification of HPV 16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol.* 2008; 3678-85.
31. Nambaru L, Meenakumari B, Swaminathan R, Rajkumar T. Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer. *Asian Pacific J of Cancer Prev.* 2009;10:355-60.

32. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriaty A, O'Connor D, Prey M et al. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA. 2002; 24: 287:2114-9.
33. Discacciati MG, de Souza CA, D'Ottaviano MGL, Angelo-Andrade LAL, Westin MCA, Rabelo-Santos SH et al. Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. Eur J Obstet Gynecol. 2011 Apr; 155(2):204-8.
34. Moscicki AB, Ma Y, Wibbelsman C, Darragh TM, Powers A, Farhat S et al.. Rate of risks for Regression of CIN-2 adolescents and young women. Obstet Gynecol. 2010 Dec; 116(6):1373-80.
35. Mc Allum B, Skkers PHH, Sadler L, MacNab H, Simcock BJ, Mekhail AK. Is the treatment of CIN 2 always necessary in women under 25 years old? AM J Obstet Gynecol. 2011; 205:478 e 1-7.
36. Simoens C, Goffin F, Simon P, Barlow P, Antoine J, Foidart JM et al. Adverse obstetrical outcomes after treatment of precancer cervical lesions: a Belgian multicentre study. BGOJ. 2012 Jun 17, doi:10.1111/j.1471-0528.2012.03429x.(Epub ahead of print).
37. Albrechtsen S, Rasmussen S, Thoresen S, Irgens LM, Iversen OE. Pregnancy outcome in women before and after cervical conisation: population based cohort study. BMJ. 2008 Sep 18; 337-43.
38. Wirth Jr TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. AM J Obst Gynecol. 2007; 197:340-5.
39. Gravitt PE, Peyton RJ, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of papillomavirus by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization reverse line blot detection method. J Clin Microbiol. 1998; 36(10):3020-27.

40. Trevisan A. Determinação da carga viral e do estado físico do papilomavirus humano em células da cérvix uterino [Tese - Doutorado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.
41. Crum CP, Beach KJ, Hedley ML, Yuan L, Lee KR, Wright et al. Dynamics of Human papillomavirus infection between biopsy and excision of cervical intraepithelial neoplasia: Results from the ZYC101a protocol. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004; 189:1348–54.
42. Cuschieri KS, Cubie HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol*. 2004; 57: 68-72.
43. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade2. *Obstet Gynecol*. 2009 Jan;113(1):18-25.
44. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Apr 2;100(7):513-7.
45. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*. 2005 Jun 20; 337(1):76-84.
46. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Garcia JCAR et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for clinical pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Am J Clin Pathol*. 2012;137:516-42.

8. Anexos

8.1. Anexo 1 – Carta Convite às Pacientes

Temos a satisfação de informá-la que o Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior do CAISM-UNICAMP, está iniciando um estudo com o objetivo de verificar se mulheres com diagnóstico de NIC 1 (uma das lesões precursoras do câncer do colo uterino que ocorre principalmente em mulheres jovens) necessitariam de tratamento imediato ou poderiam ser acompanhadas e receber tratamento apenas em situações de persistência da lesão.

Este estudo está baseado no fato de que a maioria destas lesões regride espontaneamente e apenas uma minoria das mulheres sem seguimento e tratamento progrediriam.

Os resultados beneficiarão as mulheres que fazem prevenção de câncer (Papanicolaou), pois ajudará a equipe de saúde a decidir pelo melhor tratamento para essa lesões que antecedem o câncer do colo uterino.

As informações relacionadas ao seu diagnóstico e tratamento realizados durante o estudo no CAISM – UNICAMP serão repassadas à equipe da unidade básica de saúde onde a senhora é regularmente atendida.

Para tal, a equipe que a atendeu no centro de saúde poderá encaminhá-la, ao **“Ambulatório de NIC 1”** aos cuidados da Dra. Maria Gabriela ou Dr. Carlos André.

Caso você **NÃO** esteja grávida e não pretende ficar nos próximos 2 anos, você poderá participar, marcando consulta no CAISM para o seu atendimento. O agendamento de consulta poderá ser feito pelo telefone 19-3788 9315, que será efetuado pelo profissional do Centro de Saúde no “Ambulatório de NIC 1”, que funciona às quintas-feiras das 13h30 às 18 horas.

Esperando contar com Vossa colaboração, subscrevemo-nos.

Respeitosamente,

LUIZ CARLOS ZEFERINO
Coordenador do Estudo

8.2. Anexo 2 – Consentimento Livre e Esclarecido

O câncer do colo uterino é precedido em muitos anos por alterações que ainda não são o câncer e que são completamente curáveis. Essas alterações são chamadas de NIC 1, NIC 2 e NIC 3. Existe forte correlação entre estas alterações e o papilomavírus humano (HPV).

Através da biópsia (retirada de pequeno pedaço) que foi efetuada no colo do seu útero na primeira consulta, verificamos que você apresenta NIC 2. Essa alteração pode desaparecer sem tratamento, pode permanecer como está, mas em alguns casos poderá evoluir para NIC 3. Ambas as lesões são totalmente curáveis.

Neste estudo, as mulheres que apresentam este tipo de alteração poderão receber dois tipos de conduta. Poderão ser acompanhadas pelo médico, que a cada 3 meses fará colposcopia (olhar o colo do útero com lente de aumento) e teste de Papanicolaou. Outra possibilidade: a mulher poderá ser submetida à retirada do colo onde está localizada a lesão. A escolha da conduta a ser adotada será por sorteio e não poderá ser mudada.

O objetivo deste estudo é saber qual das duas condutas é a melhor. Será verificado se a NIC 2 irá desaparecer espontaneamente sem precisar de tratamento, se manterá como tal ou se progredirá para NIC 3.

Se você for sorteada para ser acompanhada e durante o acompanhamento a alteração (NIC 2) piorar, ou se após um ano de seguimento não houver desaparecimento da alteração, você receberá o tratamento habitualmente realizado, mas que também não garante que a lesão nunca mais voltará. Após a retirada você será acompanhada a cada 3 meses.

Se concordar em participar, você responderá um questionário. Será submetida a novo exame ginecológico para que possamos colher material para saber se você tem o HPV, que talvez possa ser responsável pela progressão do NIC 2 para NIC 3. Todas as anotações que serão utilizadas na pesquisa serão identificadas apenas por um número. Todas as informações a seu respeito serão confidenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária e, se desejar, você poderá retirar-se a qualquer momento do estudo, sem prejuízo na qualidade do seu atendimento. Você poderá esclarecer qualquer dúvida que tiver em relação a este estudo com o Dr. Luiz Carlos Zeferino ou com a Dra. Samara Messias, através do telefone (19) 3788-9516 das 8 às 17 horas de segunda a sexta-feira.

Serão respeitadas as exigências do Código de Ética Médica para utilização de informação científica de dados de pacientes e respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (2000), emendada em Edimburgo, Escócia, e na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, Brasil.

Este termo de consentimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM - Unicamp e qualquer reclamação poderá ser efetuada pelo telefone (19) 3788-8936.

Se você concordar em participar do estudo, por favor, assine abaixo.

Assinatura da mulher _____

Assinatura e carimbo do médico _____

Campinas, _____ de _____ de _____

8.3. Anexo 3 – Parecer do CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/05/04.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 056/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO RANDOMIZADO DE TRATAMENTO IMEDIATO VERSUS CONDUTA EXPECTANTE PARA PACIENTES COM NIC 2 COMPROVADA POR BIÓPSIA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Cláudia B. Guedes

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP/Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros

APRESENTAÇÃO AO CEP: 04/02/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/05/05

II - OBJETIVOS

Comparar a efetividade do tratamento imediato com cirurgia de alta frequência versus a conduta expectante com controles periódicos para pacientes com NIC 2 e verificar a importância preditiva de alguns aspectos clínicos e moleculares na regressão, persistência e progressão desta lesão.

III - SUMÁRIO

Serão estudadas 90 mulheres, com idade igual ou maior que 18 anos, apresentando exame citológico de rastreamento com diagnóstico de células escamosas atípicas de significado indeterminado ou lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, diagnóstico histológico de NIC 2, lesão completamente visualizada à colposcopia. Serão submetidas ao exame clínico e colposcópico, como procedimento de rotina do serviço de patologia cervical, à biópsia de colo uterino das áreas representando maior gravidade. Será colhido material para pesquisa de HPV. Uma vez participando do estudo, de modo randomizado, será submetida ou não ao tratamento cirúrgico ablativo imediato ambulatorial. Todas as mulheres serão seguidas ambulatorialmente trimestralmente durante 1 ano, sendo realizada biópsia dirigida do colo uterino nas pacientes não submetidas à cirurgia. Se houver progressão da lesão as pacientes serão submetidas ao tratamento cirúrgico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está descrito adequadamente e destina-se a avaliar a necessidade do tratamento ativo para NIC 2, pois alguns estudos demonstraram regressão espontânea da lesão em até 54% dos casos. A escolha de qualquer das opções não oferece risco à saúde das mulheres pois serão

acompanhadas trimestralmente. Trata-se de pesquisa que iria ser realizada em conjunto e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. O Termo de Consentimento atende às especificações.

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 V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de maio de 2004.


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

