

PREVENÇÃO DO CÂNCER CERVICAL: ASSOCIAÇÃO DA CITOLOGIA ONCÓTICA A NOVAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NA DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

CERVICAL CANCER PREVENTION: ASSOCIATION OF NEW TECHNIQUES OF MOLECULAR BIOLOGY WITH THE ONCOTIC CYTOLOGY IN DETECTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV)

Márcia Elena Z Bringham¹, Ticiano G Dozza¹, Tiago G Dozza¹, Toni Ricardo Martins², Maria Luiza Bazzo³

RESUMO

Introdução: o câncer do colo uterino é conhecido como uma das causas mais frequentes de óbito na população feminina em todo o mundo. A infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o câncer cervical e suas lesões precursoras. **Objetivo:** avaliar os métodos diagnósticos do câncer cervical: citologia oncológica, DNA do HPV pela PCR, detecção do RNA das proteínas E6 e E7 dos HPV de alto risco, para acrescentar novos marcadores na detecção do HPV em amostras com citologia alterada. **Métodos:** foram avaliados os resultados da citologia oncológica de 3.000 pacientes, atendidas no Laboratório Vital, Nonoai – RS, de março de 2009 a janeiro de 2010, classificando-as conforme a faixa etária e codificação de Bethesda, 2001. Foram selecionados dois grupos: o grupo A incluiu pacientes com citologia prévia alterada e o grupo B, pacientes com citologia sem anormalidades. Foram coletadas 47 amostras, 22 do grupo A e 25 do grupo B. Três amostras do grupo B apresentaram inibidores da PCR e foram excluídas. A análise dos dados considerou 22 amostras em cada grupo. A detecção do HPV foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* consenso MY9/11 e GP5+/6+. O RNA das proteínas E6 e E7 foi detectado pelo método *Real-Time* NASBA. **Resultados:** nas amostras do grupo A, houve detecção do DNA/HPV pela PCR em 14 (64%) amostras, e RNA das proteínas E6 e E7 do HPV em seis (27%) amostras. Todas as 22 amostras do grupo B foram negativas nos métodos moleculares. **Conclusão:** neste estudo, a citologia prévia alterada associada a testes moleculares indica a necessidade de monitoramento ou intervenção terapêutica das pacientes. Assim, conclui-se que a citologia oncológica associada à detecção do DNA do HPV pela PCR e à expressão das oncoproteínas E6 e E7 é a alternativa para identificar precocemente pacientes com elevado risco de desenvolver o câncer cervical.

Palavras-chave: HPV, DST, PCR, E6, E7, câncer

ABSTRACT

Introduction: worldwide, the cervical cancer is known as one of the most frequent cause of death in female population. Persistent infection with oncogenic human papillomavirus (HPV) is the main risk factor for cervical cancer and its precursor lesions. **Objective:** to evaluate the diagnostic methods of cervical cancer: oncotoc cytology, HPV DNA by PCR, detection of mRNA E6 / E7 proteins of high-risk HPV, to add new markers in the detection of HPV. **Methods:** were evaluated 3,000 results of oncotoc cytology from patients referred to Vital Laboratory, Nonoai- RS, Brazil, from March 2009 to January 2010. The results were grouped according age and Bethesda classification, 2001. Group A included patients with previous altered cytology and Group B patients without abnormalities in cytology. To molecular tests were collected 47 samples, 22 from group A and 25 from group B. Three samples from group B presented PCR inhibitors and were excluded. The detection of HPV was made by polymerase chain reaction (PCR) using the consensus primers MY9/11 and GP5 +/6 +. The mRNA E6 / E7 proteins were detected by real-time NASBA. **Results:** in samples of group A, DNA/HPV was detected in 14 (64%) samples, and mRNA E6 / E7 proteins of HPV was detected in 6 (27%) samples. All 22 samples of group B were negative to molecular methods. **Conclusion:** in this study, the previous altered cytology associated with molecular methods indicates the need for monitoring or therapeutic intervention of patients. The oncotoc cytology associated with the detection of HPV DNA by PCR and the expression of oncoproteins E6 / E7 are alternatives to identify early lesions in patients with high risk of developing cervical cancer.

Keywords: HPV, STD, PCR, E6, E7, cancer

INTRODUÇÃO

O carcinoma de colo uterino apresenta-se como a segunda neoplasia mais prevalente na população feminina, responsável por cerca de 250.000 mortes a cada ano no mundo^{1,2}. No Brasil, esta neoplasia situa-se como a terceira mais comum, apenas suplantada pelo câncer de pele (não melanoma) e pelo câncer de mama, sendo a quarta causa de morte feminina por câncer³.

A despeito destes números elevados, este é um tipo de câncer altamente prevenível, pois possui um agente específico, o papilomavírus humano (HPV) e pode ser rastreado em suas fases pré-

-malignas⁴. É considerado o câncer que apresenta o maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente⁵.

O HPV desempenha papel central na carcinogênese, está implicado em 99,7% dos casos mundiais de carcinoma cervical e, atualmente, é reconhecido como o agente causal inequívoco de condilomas, neoplasias intraepiteliais e carcinomas cervicais⁵.

Mais de 200 tipos de HPV foram identificados por meio de análises das sequências de DNA. Os diferentes tipos virais variam no seu tropismo tecidual, nas associações com diferentes lesões e no seu potencial oncogênico⁶. Cerca de 40 tipos de HPV infectam o trato genital, e destes pelo menos 20 estão associados ao câncer de colo do útero⁶⁻⁸.

Os HPV são classificados de acordo com seu potencial oncogênico, HPV 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco quando associados a lesões benignas, enquanto HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70 são de alto risco quando associados ao câncer cervical^{6,7}.

¹ Curso de Especialização em Citologia – CCS – Universidade Federal de Santa Catarina.

² Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – CCS – Universidade Federal de Santa Catarina.

³ Professora do Departamento de Análises Clínicas – CCS – Universidade Federal de Santa Catarina.

Expressão gênica das proteínas E6 e E7 do HPV (mRNA de E6 e E7 de HPV)

Tecnologias que permitem detectar e quantificar os transcritos dos oncogenes virais E6 e E7 são estratégias atuais que visam avaliar a atividade oncogênica viral. Os principais fatores que provocam a transformação do epitélio do colo uterino são desencadeados pela expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7 dos HPV de alto risco no epitélio infectado²².

As proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 se ligam, respectivamente, às proteínas p53 e pRB, que são proteínas reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do tumor, que determinam desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, levando ao câncer por impedirem a apoptose e causar imortalização celular, confirmando assim o papel do HPV na carcinogênese viral^{22,23}.

Por este motivo, a pesquisa dos transcritos E6 e E7 de HPV de alto risco aumenta a especificidade e sensibilidade dos testes usados na triagem (citologia e detecção de DNA do HPV), indicando as lesões com maior chance de progressão ao câncer²². As oncoproteínas E6/E7 são, portanto, marcadores precoces de câncer¹.

OBJETIVO

Analisar os métodos laboratoriais para o diagnóstico do câncer cervical (citologia e detecção do DNA-HPV) incluindo a expressão gênica das proteínas E6 e E7 do HPV, a fim de acrescentar novos marcadores na detecção do HPV e avaliação da oncogenicidade dos HPV de alto risco, representando uma informação relevante à classe médica para a triagem de citologias alteradas (ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL) no intuito de auxiliar na conduta clínica das lesões com alto potencial oncogênico, que poderão evoluir ao câncer cervical.

MÉTODOS

Foram avaliados os resultados de citologias esfoliativas de 3.000 pacientes, que realizaram o exame citopatológico convencional pelo método de Papanicolaou no Laboratório Vital, de Nonoai – RS, no período de março de 2009 a janeiro de 2010, classificando-as de acordo com a faixa etária e a classificação de Bethesda, 2001.

Das pacientes que realizaram o exame citopatológico no período avaliado, foram selecionados dois grupos de pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Destas, foi coletada uma amostra cervical para a detecção do DNA do HPV e para a expressão gênica de E6 e E7. Como critério para inclusão neste estudo, os grupos foram selecionados conforme o resultado da citologia prévia. O primeiro grupo, definido como Grupo A, incluiu mulheres com citologia prévia alterada (ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL). O segundo grupo incluiu mulheres com citologia dentro dos limites de normalidade (NLIM), definido como Grupo B. Foram coletadas 47 amostras, 22 de pacientes do Grupo A e 25 de pacientes do Grupo B. Deste total, três amostras do Grupo B apresentaram a presença de inibidores da PCR e foram excluídas. Para a análise dos dados, consideraram-se 22 amostras do Grupo A e 22 amostras do Grupo B.

A detecção do HPV foi feita pela amplificação do DNA, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* consenso MY9/11 e GP5+/6+. A detecção do mRNA de E6 e E7 de HPV de alto risco foi feita pelo método *Real-Time* NASBA. A coleta do material cervical foi realizada utilizando-se o *kit* Thin-Prep/PreservCyt (Cytic Corp. – USA) Estes testes foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias – LBMM/CCS/UFSC.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado em 27/04/2009 sob nº 248158.

RESULTADOS

A análise dos resultados das citologias esfoliativas de 3.000 pacientes, de acordo com a classificação de Bethesda (2001), mostrou 2.827 (94,23%) laudos de citologias normais, classificadas como NLIM. Dentre os 173 (5,77%) laudos que apresentaram alterações citológicas, verificaram-se: 96 (3,2%) pacientes com ASC-US, oito (0,27%) pacientes com ASC-H, 45 (1,50%) com LSIL, 15 (0,50%) com HSIL, sete (0,23%) com carcinoma escamoso e duas (0,07%) com adenocarcinoma.

Em relação à faixa etária, os resultados alterados se distribuíram entre 15 e 35 anos, com predomínio de ASC-US entre 25 e 35 anos e LSIL entre 15 e 25 anos, decrescendo a incidência em idades mais avançadas. Entretanto, carcinoma escamoso e adenocarcinoma estão presentes, principalmente, em pacientes com idade superior a 36 anos (**Tabela 1**).

Das pacientes do Grupo A, com citologia prévia alterada (ASC-US, LSIL, ASC-H e HSIL), houve detecção do DNA do HPV na PCR qualitativa em 14 (64%) das 22 amostras, e mRNA de E6 e E7 foi encontrado em seis (27%) das 22 amostras. Nas 22 amostras das pacientes do Grupo B, sem alterações citológicas (NLIM), não houve detecção do DNA de HPV pela PCR e nem do mRNA de E6 e E7 (**Tabela 2**).

Das seis amostras positivas para mRNA de E6 e E7, duas amostras são do HPV subtipo 31, uma do HPV 16, duas do HPV 18 e uma apresentou coinfeção com os subtipos HPV 16 e 33. Na PCR qualitativa, das 14 amostras positivas, seis concordaram com os subtipos encontrados na detecção de mRNA de E6 e E7. Das oito amostras que tiveram amplificação apenas na PCR qualitativa, os subtipos encontrados foram de baixo grau, e destas, sete foram subtipadas como HPV 6 e uma, como HPV 11 (**Tabela 3**).

DISCUSSÃO

O Ministério da Saúde, por intermédio do Instituto Nacional de Câncer, busca desenvolver ações para diminuir as altas taxas de mortalidade por câncer cervical, pois as ações para seu controle contam com tecnologias para o diagnóstico e tratamento de lesões precursoras, permitindo a cura em 100% dos casos diagnosticados na fase inicial. Estas ações contemplam a detecção precoce por meio do exame citopatológico; a garantia do tratamento adequado da doença e de suas lesões⁵.

A distribuição dos resultados citológicos alterados do presente estudo, correspondente a 5,77% do total, considerando-se atípias de significado indeterminado, lesões pré-malignas e malignas, concorda com estudos nos quais estas alterações totalizaram 6,1% dos resultados alterados²⁵.

Tabela 1 – Distribuição dos resultados dos exames citológicos classificados segundo Bethesda (2001) e a faixa etária das pacientes.

Resultados das citologias realizadas no período de março/2009 a janeiro/2010							
Resultados de Citologia	Faixa Etária					Total	Resultados (%)
	15-25	26-35	36-45	46-55	> 55		
NLIM	398	728	744	568	389	2.827	94,23%
ASC-US	33	39	17	6	1	96	3,20%
ASC-H	0	2	3	2	1	8	0,27%
LSIL	23	12	8	1	1	45	1,50%
HSIL	1	4	3	3	4	15	0,50%
Ca escamoso	–	1	1	2	3	7	0,23%
Adenocarcinoma	–	–	1	–	1	2	0,07%
Total	455	786	777	582	400	3.000	100,00%

NLIM – Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade.

ASC-US – Células escamosas atípicas de significado indeterminado.

ASC-H – Células escamosas atípicas de significado indeterminado, não se pode excluir lesão de alto grau.

LSIL – Lesão intraepitelial cervical de baixo grau.

HSIL – Lesão intraepitelial cervical de alto grau.

Ca escamoso – Carcinoma escamoso.

Tabela 2 – Distribuição dos resultados das pacientes dos Grupos A e B, de acordo com os resultados da PCR para HPV e expressão gênica das proteínas E6 e E7 (mRNA de E6 e E7)

	Citologia Prévia	Número de Pacientes	PCR Positiva*	PCR Negativa*	E6/E7 Positiva	E6/E7 Negativa
Grupo A	ASC-US	11	5	6	1	10
	ASC-H	3	3	0	2	1
	LSIL	7	5	2	3	4
	HSIL	1	1	0	0	1
	Total	22	14	8	6	16
Grupo B	NLIM	22	0	0	0	22
	Total	22	0	0	0	22

(iniciadores MY 09/11 e/ou GP5+, GP6+)

Em relação aos resultados citológicos com ASC-US o percentual de 3,2% atende o estabelecido no consenso de que este diagnóstico não deve ultrapassar a 5% dos resultados^{26,27}. Também a proporção de ASC-H de 0,27% não ultrapassou o percentual de 10% do total de ASC²⁰. A idade das pacientes com diagnóstico de ASC-US predominou entre 15 e 35 anos de idade. Esse dado é semelhante ao de estudos realizados²⁹.

A proporção entre os diagnósticos de ASC-US e LSIL encontrada, de 2:1, também era a esperada, pois segundo a literatura a proporção entre o diagnóstico de ASC-US e SIL aceita é de até 3:1^{12,20}. Os baixos índices de carcinoma escamoso e adenocarcinoma devem-se ao diagnóstico precoce e ao tratamento de lesões precursoras do câncer cervical²⁷.

A detecção de HPV de baixo risco não está diretamente relacionada com o desenvolvimento de câncer cervical, entretanto em nossa casuística todos os sete casos encontrados (HPV 6 e HPV 11) são de pacientes com citologias alteradas, que devem ser monitoradas para avaliar uma possível remissão espontânea da infecção.

Com a comprovação de que a persistência da infecção por HPV de alto risco e o câncer do colo uterino estão diretamente relacionados, os testes negativos para a presença viral ou HPV de baixo risco conferem um alto valor preditivo negativo para o desenvolvimento desta doença. Desta forma, testes negativos para a presença de HPV de alto risco tornam-se de suma importância para a triagem de mulheres que apresentam esfregaço do colo uterino alterado²⁸.

Dentre as pacientes com citologia dentro dos limites de normalidade, o DNA do HPV não foi detectado em nenhum caso e, consequentemente, não houve expressão gênica das proteínas E6 e E7. Embora este estudo tenha sido conduzido com uma pequena amostra, os dados encontrados não concordam com estudos que relatam prevalência de 3,4 a 14% de DNA do HPV detectado pela PCR em espécimes com citologia oncológica considerada normal³⁰. A detecção de HPV, nestes casos, sugere latência clínica. Outros estudos demonstram que os HPV de baixo risco podem ser encontrados em parcela significativa de mulheres sexualmente ativas, oscilando entre 10% a 40% dos casos³¹. A divergência dos nossos achados pode estar

Tabela 3 – Distribuição dos resultados das PCR para HPV e da expressão gênica das proteínas E6 e E7 (mRNA de E6 e E7), de acordo com os resultados das citologias prévias.

Citologia Prévia	Número de Pacientes	PCR Subtipo	E6/E7 Subtipo
ASC-US	1	HPV 18	HPV 18
	3	HPV 6	–
	1	HPV 11	–
ASC-H	2	HPV 31	HPV 31
	1	HPV 6	–
	1	HPV 18	HPV 18
	1	HPV 16	HPV 16
LSIL	1	HPV 16 e HPV 33	HPV 16 e HPV 33
	2	HPV 6	–
	1	Indeterminada	–
HSIL	1	HPV 6	–

relacionada com o número amostral ou pode ser resultado de políticas de saúde preventivas e educacionais adotadas no município onde foram coletadas as amostras.

Das pacientes com resultados de citologia prévia alterados, submetidos aos exames de PCR para HPV, houve uma positividade representativa, confirmando os dados de estudos que recomendam o acompanhamento de mulheres que tiveram diagnóstico de células escamosas atípicas ou LSIL na citologia com testes moleculares, como o teste para detecção do DNA do HPV e a subtipagem do vírus²⁰.

A positividade dos testes moleculares em cinco das 11 pacientes com ASC-US concorda com dados de que 40 a 50% das mulheres com ASC-US na citologia cervical são positivas para o DNA do HPV. Assim, a utilização do teste para detectar o DNA do HPV permite identificar adequadamente as mulheres com ASC-US que necessitam de acompanhamento posterior^{20,29}.

A detecção do DNA do HPV pela PCR neste estudo, em 14 de 22 pacientes com citologia prévia alterada, indica apenas a infecção pelo HPV, que pode ser transitente ou persistente, por isso torna-se importante a detecção do mRNA das proteínas E6 e E7 do HPV, a fim de identificar as lesões com alto potencial de evoluir ao câncer. Neste estudo foram detectadas em seis das 22 pacientes com citologia prévia alterada.

Diversas publicações têm demonstrado que a detecção das oncoproteínas E6/E7 do HPV está intimamente relacionada à presença de lesões pré-cancerosas de alto grau em mulheres com resultado de citologia anormal. Este tipo de teste é mais específico e tem maior valor clínico, se comparado aos testes de HPV-DNA, identificando, deste modo, quais as mulheres com alto risco de evoluir ao câncer cervical, e reduzindo, assim, o número de exames invasivos desnecessários^{33,34}.

O câncer cervical invasivo é uma doença passível de prevenção, por meio de detecção precoce e tratamento de lesões precursoras.

Atualmente, além da citologia oncótica e da detecção do DNA-HPV, diversos biomarcadores estão sendo analisados. Os dados mais contundentes são associados à detecção persistente do genoma de HPV de alto risco e a avaliação dos transcritos de E6/E7 dos HPV dos tipos 16, 18, 31, 33 e 45 em amostras do colo uterino.

Considerando-se a rápida evolução e o aprimoramento de técnicas moleculares que permitem avaliar alterações celulares, acredita-se que a análise simultânea destes marcadores possa contribuir para a queda significativa do número de pacientes que evoluem ao câncer cervical.

CONCLUSÃO

A associação dos resultados da citologia prévia com os resultados dos testes moleculares do presente estudo indicou a necessidade de se intervir rapidamente em seis pacientes e de monitorar outras oito pacientes, que totalizam 63% da nossa casuística alterada. Esses dados apontam que a identificação e a utilização de ferramentas que possam complementar tanto o diagnóstico como o rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino é de suma importância. E uma medida de saúde pública indispensável é identificar as mulheres com elevado risco de desenvolvimento de câncer de útero ainda em estágio inicial.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zur-Hausen H. papillomaviruses abd câncer: from basic students to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5): 342-350.
- Mahmud SM, Franco EL. 2004. An overview of epidemiological and public health research on HPVs. *Papillomavirus Rep* 2004; 15:121-123.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003; 45(suppl. 3): 306-14.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1-17.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-527.
- Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 3-13.
- Silva RJC. Prevalência da infecção pelo HPV em homens soropositivos para HIV e homens parceiros de mulheres com infecção pelo HPV. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006 (Tese de mestrado).
- Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID. 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: 873-880.
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26(10): 1-16.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-

- blind placebo- controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005; 6(5): 271-278.
12. Wright Jr TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening tests. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11(4): 201-222.
 13. Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8): 935-939.
 14. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storzh K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 727-746.
 15. Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103(2): 04-09.
 16. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* 2006; 3: 63-70.
 17. Tang WK. Oncogenic human papillomavirus infection: epidemiology in local high-risk women. *Hong Kong Dermatol Venereol Bulletin* 2002; 10(4): 160-163.
 18. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-2119.
 19. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Publica* 2002; 36: 95-100.
 20. ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188(6): 1383-1392.
 21. Paraskeva E, Malamou-Mitsi V, Koliopoulos G et al. Expanded cytological referral criteria for colposcopy in cervical screening: comparison with human papillomavirus testing. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 355-359.
 22. Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* 2007; 23(4): 315-330.
 23. Di Bonito P, Grasso F, Mochi S et al. Serum antibody response to human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV 16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins. *Infect Agent Cancer* 2006, 1: 6.
 24. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama – Viva Mulher. 1996-2007. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/INCA, 2007.
 25. Nascimento MDSB, Pereira ACS, Silva AMN, Silva LM, De CastroViana GM. Programa Nacional de combate ao câncer de colo uterino no estado do Maranhão: Análise de aspectos citológicos e epidemiológicos. *Acta Oncol Bras* 2003; 23(3): 530.
 26. Lima DNO, Câmara S, Mattos MGG, Ramalho R. Diagnóstico citológico de Ascus: sua importância na conduta clínica. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(1): 45-49.
 27. Ivor B. Evaluation of neoplasia of the female lower genital tract. Disponível em: <http://cancer.med.upenn.edu/classroom/colp/> Acessado em: 07/07/2000.
 28. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 293-299.
 29. Eleutério JJ, Cavalcante JR, Santiago RO, Silva DS. Colposcopia e Histologia no Diagnóstico de Lesões Epiteliais do Colo Uterino. *Citologia Oncótica* 2004; 63: 126-130.
 30. Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(4): 293-299.
 31. Van Den Brulle AJ. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal Cancer* 1991; 48: 404-408.
 32. Noronha V, Mello W, Villa L, Britto A, Macedo R, Bisi F et al. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1999; 32: 235-240.
 33. Cattani P. RNA (E6 and E7) Assays versus DNA (E6 and E7) Assays for Risk Evaluation for Women Infected with Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(7): 2136-2141.
 34. Lie AK, Risberg B, Borge B et al. DNA- versus RNA-based methods for HPV detection in cervical neoplasia *Gynec Onc* 2005; 97(3): 908-915.
 35. Cuschieri KS, Whitley MJ, Cubie HA. HPV type specific DNA and RNA persistence –implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 2004; 73: 65-70.

Endereço para correspondência:

MÁRCIA ELENA ZAMIN BRINGHENTI

Rua Borges de Medeiros, 963, Nonoai – RS

CEP: 99600-000

Tel.: 54 3362-1151 – Fax: 54 3362-1727

E-mail: marciaezb@hotmail.com

Recebido em: 04.10.2010

Aprovado em: 17.11.2010