
HPV E CÂNCER DO COLO UTERINO

Siderley de Souza Carneiro,¹ Marise Amaral Rebouças Moreira² e Joaquim Caetano de Almeida Netto³

RESUMO

O câncer de colo uterino é um dos raros exemplos de neoplasia prevenível. Desde a década de 1920, quando o Dr. Georges Papanicolaou criou a citologia, amplos programas de triagem populacional e tratamento de lesões precursoras levaram a uma drástica redução na incidência dessa neoplasia. Esse avanço, todavia, não foi suficiente para impedir que o câncer de colo uterino represente ainda cerca de 12% dos tumores femininos. Graças, porém, à existência de agente etiológico viral bem definido – o papilomavírus humano (HPV) – e ao grande avanço recente da biologia molecular têm surgido novas possibilidades de diagnóstico precoce, baseado na pesquisa viral, por novas técnicas, como a captura híbrida. Também bastante promissora é a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina anti-HPV eficaz, para os próximos anos.

DESCRITORES: Câncer de colo uterino. Papilomavírus humano. Oncogênese. Prevenção e controle.

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é uma neoplasia que ainda apresenta um impacto devastador em todo o mundo (12% dos tumores femininos), com uma incidência de mais de quinhentos mil casos anuais (85), situando-se como o segundo câncer mais fatal e ainda como o mais prevalente em alguns países em

-
1. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás.
 2. Departamento de Patologia e Imagenologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.
 3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Siderley de Souza Carneiro. Av. das Bandeiras, 300, Vila Brasília, CEP 74905-180 Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil

Recebido para publicação em 14/1/2003. Revisto em 15/1/2004. Aceito em 28/1/2004.

desenvolvimento. Em vários países, inclusive no Brasil, o carcinoma de colo uterino deixou de ser o câncer mais freqüente (posição ocupada pelo carcinoma mamário) graças à implantação de programas de prevenção baseados na triagem citológica em massa da população, o que permitiu o tratamento das lesões precursoras antes de sua evolução para neoplasia invasora (Instituto Nacional do Câncer – INCA 2002).

Em Goiânia o carcinoma mamário ultrapassou em freqüência o câncer cervical a partir de 1992 (21). De acordo com os mais recentes dados disponíveis, o coeficiente de incidência bruto de câncer de colo uterino em 1997 foi de 19,47 por 100.000 habitantes, e a doença foi responsável por 69 mortes no mesmo ano (21).

A grande maioria dos cânceres cervicais é representada por carcinomas escamosos. Quanto aos carcinomas não escamosos (CNE), os principais tipos são os adenocarcinomas, os tumores de colisão (adenocarcinoma associado ao carcinoma escamoso) e os carcinomas adenoescamosos (14, 90). Os CNEs em Goiás, nos últimos quinze anos, têm mantido uma freqüência constante de 12% dos carcinomas de colo operados no Hospital Araújo Jorge (hospital de câncer), o que representa aproximadamente um caso novo a cada vinte dias (Moreira, comunicação pessoal).

O câncer cervical tem algumas características peculiares em relação a outros tipos de neoplasia. A primeira delas é o fato de ele ser uma doença de longa evolução, podendo ser detectada em fases precoces, antes de apresentar todas as propriedades que definem o fenótipo maligno (invasão e metástase) (20, 85). A segunda característica é a existência de um agente etiológico infeccioso conhecido, o *papilomavírus humano* (HPV) (58, 96). Graças a essas peculiaridades, o câncer cervical é uma doença que desfruta de grandes possibilidades de prevenção. A citologia vaginal (Papanicolaou) é um dos recursos mais importantes já disponibilizados em medicina preventiva. Esse teste foi criado pelo médico grego Georges Papanicolaou, e é considerado um dos avanços mais significativos no controle de câncer, tendo contribuído para reduzir em mais de 70%, em alguns países, a mortalidade por câncer de colo uterino (37). É um método simples e de baixo custo, capaz de diagnosticar as lesões precursoras do câncer cervical, que podem ser tratadas e eliminadas antes de evoluir para neoplasia invasora (95). A existência de um agente etiológico viral implica também a possibilidade de aplicação de outros métodos diagnósticos específicos, baseados na pesquisa de DNA viral (86), e aponta para a perspectiva do desenvolvimento de uma vacina (46).

OHPV

O HPV possui como genoma uma molécula de DNA de fita dupla, circular, com aproximadamente oito mil nucleotídeos. É um vírus pequeno, com cerca de 55 nm de diâmetro (82).

O genoma viral apresenta de oito a dez genes e uma região não codificante (non-coding region - NRC). O capsídeo é composto por duas proteínas que são codificadas por genes das chamadas regiões tardias, L1("L"do inglês *late*), a principal, e L2, a secundária. A região E ("E"do inglês *early*) apresenta os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que codificam as respectivas proteínas (Figura 1) (11).

Os papilomavírus infectam apenas os humanos. Os vírus exibem tropismo tecidual, infectando quase exclusivamente epitélios escamosos, como a pele e as mucosas (93).

Quando o HPV é transmitido, ele entra nas células epiteliais pela camada basal e produz duas categorias de alterações epiteliais, ambas importantes para a classificação diagnóstica. A primeira alteração é o efeito citopático viral, ou coilocitose, que ocorre nas células maduras, terminalmente diferenciadas e incapazes de se dividir. Esse efeito é resultante da ocorrência do ciclo de replicação viral, sendo facilitado pela maturação epitelial. A segunda alteração é uma anormalidade no crescimento e na diferenciação celular, que tem origem nas células basais e parabasais, com capacidade de multiplicação (20).

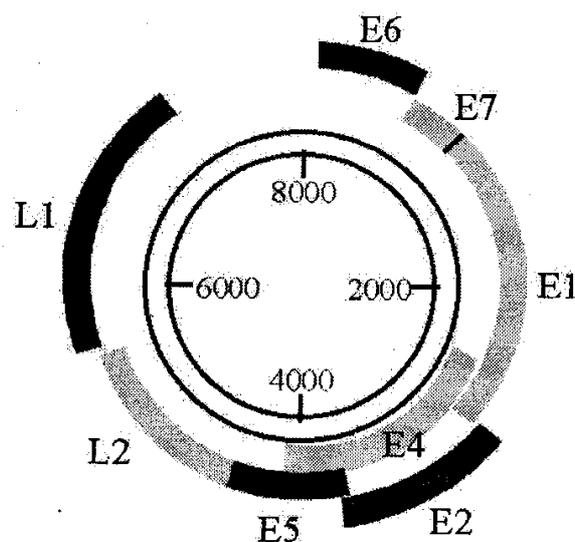


Figura 1. O genoma do HPV 16 (93)

Os genomas dos HPVs podem ser encontrados como epissomas no núcleo daquelas células infectadas que não apresentam alterações morfológicas. Entretanto, em algumas lesões de baixo grau e na maioria das lesões de alto grau, incluindo câncer, os genomas do HPV são integrados aos da célula hospedeira (50). A ruptura da região E1-E2 resulta em expressão aumentada e estabilização dos transcritos de E6 e E7, sendo uma ruptura necessária para a integração do genoma viral (41).

Tipos de HPV

Somente quando algumas técnicas de biologia molecular tornaram-se disponíveis, os diferentes tipos de HPV puderam ser identificados. Estes diferem não apenas em suas seqüências genômicas, mas também nas manifestações clínicas que produzem. Alguns tipos têm maior tendência para infectar a pele, e outros, as mucosas; apenas um limitado número é considerado como de potencial oncogênico (11).

Em 1995, no *Workshop* internacional sobre HPV, foi definido o critério atualmente aceito para caracterização de novos tipos desse vírus. Uma diferença maior que 10% na região L1 do genoma permite a classificação de um tipo diferente de HPV (5, 48).

Até hoje mais de 120 tipos de HPV já foram identificados (34). Apesar da grande variedade de tipos virais, apenas um limitado número (cerca de quarenta) é considerado como de importância, por infectar o trato anogenital e ser encontrado em carcinomas. Os principais vírus nessa categoria são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59 e 69, considerados de alto risco para câncer cervical. Os tipos 6 e 11 são encontrados em verrugas genitais (condiloma acuminado), constituindo o grupo considerado de baixo risco (48).

HPV como agente etiológico do câncer cervical

É antiga a idéia de que o câncer cervical esteja associado a agentes infecciosos, uma vez que, epidemiologicamente, a doença comporta-se como sexualmente transmissível. Um dos primeiros agentes infecciosos implicados foi a *Trichomonas vaginalis* (77), isso na década de 1960. Nos anos 70 o vírus do herpes simples também foi considerado um carcinogênico cervical (4). No final da década de 1970, início dos anos 80, o HPV, por sua vez, começou a ser incriminado na gênese do câncer de colo uterino, em parte devido ao surgimento de técnicas de biologia molecular que permitiram sua identificação (53, 89).

Em 1995, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) reconheceu que havia evidências suficientes para categorizar os HPVs tipo 16 e 18 como carcinogênicos humanos, sendo as evidências existentes ainda insuficientes para se concluir a respeito de outros subtipos de HPV (58). O Estudo Biológico Internacional em Câncer Cervical, realizado em 1999 e que utilizou material coletado em 22 países, relatou uma prevalência mundial de 93% de HPV nos cânceres cervicais invasores. O estudo afirma ainda que a negatividade de 7% dos casos poderia ter sido decorrente tanto da ausência de HPV, quanto de resultado falso-negativo dos testes. Quando a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada nos casos em que havia disponível material congelado (e portanto mais bem preservado) do câncer cervical, a positividade

para HPV-DNA foi de 99,7% (contra cerca de 14% na população geral) (20, 96). Com base nesses estudos, segundo os quais virtualmente todos os carcinomas cervicais contêm HPV-DNA, a IARC afirmou, então, que o HPV é um agente necessário para a carcinogênese cervical (96).

A infecção por HPV é bastante freqüente em mulheres com menos de 25 anos. Na grande maioria, porém, o vírus é eliminado em uma média de 8 meses. Essa eliminação é conseqüência da resposta imunológica, que também leva à regressão espontânea de mais de 80% das lesões de baixo grau em menos de 2 anos. Em alguns casos, entretanto, o vírus persiste, sendo a persistência viral o mais importante fator isolado relacionado à progressão da infecção para lesão de alto grau (69). Entretanto apenas uma fração das pacientes com infecção persistente pelo HPV desenvolve câncer cervical, o que indica que o vírus sozinho, sem a participação de co-fatores, não é suficiente para causar câncer do colo uterino. Entre os co-fatores incluem-se: multiparidade (59), tabagismo (3, 54), uso de anticoncepcionais (75), deficiências nutricionais, co-infecção por *Chlamydia trachomatis* (76) e outros.

Mecanismos de oncogênese e o HPV

As células cancerosas crescem de maneira desregulada, em conseqüência da aquisição seqüencial de mutações somáticas em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celulares ou que mantêm a integridade do genoma (19). As mutações podem ser provocadas por agentes ambientais (radiação e produtos químicos) ou por elementos produzidos durante o metabolismo celular normal (radicais livres derivados do oxigênio). Embora o mecanismo mais comum de mutagênese provavelmente esteja relacionado com erros espontâneos na replicação e no reparo do DNA, a maioria desses erros não tem conseqüência importante. Por sua vez, os agentes que produzem mutações em genes regulatórios são potencialmente carcinogênicos. Esses genes, que constituem os principais envolvidos na patogenia do câncer, são os oncogenes, os genes supressores de tumores (antioncogenes) e os genes que regulam a apoptose (71).

Os oncogenes são derivados de protooncogenes, genes celulares que promovem o crescimento e o desenvolvimento normais. Quando, por exemplo, uma seqüência de DNA viral é inserida próximo ao protooncogene, ele pode ser convertido em um oncogene celular. O produto de um oncogene é a oncoproteína. As oncoproteínas são semelhantes ao produto normal dos protooncogenes, diferindo desse produto apenas por não terem papel regulatório importante e pelo fato de sua produção não depender de fatores celulares ou de outros sinais externos, não sendo assim controlada por mecanismos de retroalimentação (9). Alguns exemplos de oncogenes são as ciclinas e as cinases

dependentes de ciclinas, estas últimas constituindo proteínas estimuladoras da progressão do ciclo celular (19).

Enquanto os protooncogenes codificam proteínas que promovem o crescimento, os antioncogenes têm ação antagônica, sendo responsáveis por interromper o crescimento celular. Exemplos dessa última categoria são o gene do retinoblastoma e o gene p53 (o mais freqüente alvo de alteração genética em tumores humanos) (66). A perda de função desses genes é um evento essencial na oncogênese humana. O gene do retinoblastoma codifica uma proteína (pRb) que constitui uma barreira no ciclo celular, na passagem da fase G₁ para a fase S (106). Já o p53 é responsável pelo policiamento constante da célula, aumentando rapidamente a expressão da proteína p53 quando há agressão ao material genético e estimulando a expressão de uma série de genes que medeiam tanto a paralisação do ciclo celular, como a indução da apoptose e o reparo do DNA (66).

Por último, entre os reguladores da apoptose, destacam-se os genes bcl-2, c-myc e bax. O bcl-2 inibe a apoptose, enquanto o bax e o c-myc a estimulam (26, 66, 100).

A ação oncogênica dos HPVs de alto risco é decorrente da síntese de algumas proteínas, chamadas oncoproteínas virais, com destaque para E6 e E7. A oncoproteína E5 parece não ter participação na oncogênese humana, uma vez que não é expressa nos tumores, devido à ruptura do genoma viral, quando ele se torna integrado aos cromossomos celulares. Apesar disso, as ações celulares da proteína E5 podem ser fundamentais na preparação para a transformação celular, quando então as funções das proteínas E6 e E7 tornam-se mais importantes (52). Essas funções incluem atividades estimuladoras de crescimento e de transformação celular, em que as duas oncoproteínas interferem com a ação de alguns dos genes citados anteriormente. As proteínas E6 e E7 são consistentemente expressas em células malignas de cânceres cervicais que carregam HPV-DNA. Elas são capazes de imortalizar células humanas, agindo cooperativamente ou mesmo individualmente (57, 107).

A proteína E6 tem a capacidade de ligar-se à proteína p53, degradando-a e assim desempenhando ação antiapoptótica (27). Ela também pode levar à instabilidade cromossômica e potencializar a integração de DNA viral e a mutagenicidade (36, 68). Já a proteína E7 pode ligar-se à proteína do retinoblastoma, inativando-a e liberando a ação do E2F, um ativador de promotores de genes que codificam sinais positivos de crescimento celular, como o c-myc e o n-myc (32). O resultado é a liberação da ação estimuladora dos produtos desses genes sobre a progressão do ciclo celular. A E7 também é capaz de ativar a transcrição do E2F sem a presença da proteína do retinoblastoma e de ativar as ciclinas E e A (40), além de poder levar à superexpressão das proteínas p16 (43) e p73 (10). Outra possível ação da proteína E7 seria a de inibir, em camundongos, a ação de células T CD8⁺ (91), contra

células epiteliais infectadas. De fato, o HPV parece ter uma grande capacidade de evitar ou subverter a resposta imune do hospedeiro (92).

Apesar de todos os avanços no conhecimento, a patogênese molecular do câncer causado pelos HPVs de alto risco ainda não é completamente conhecida. Muitas lacunas devem ser preenchidas até a completa elucidação dos mecanismos de oncogênese do HPV.

Diagnóstico laboratorial da infecção por HPV e do câncer cervical

A grande importância de se diagnosticar a infecção por HPV decorre de seu papel, hoje reconhecido, como agente etiológico do câncer cervical. Dessa forma, o diagnóstico da infecção não pode ser separado do diagnóstico da neoplasia. Esse diagnóstico pode ser feito clinicamente, naqueles poucos casos em que a infecção produz lesões macroscópicas, como o condiloma em um extremo e o carcinoma invasor no outro. Os principais métodos laboratoriais disponíveis são a citologia, a histopatologia e os métodos de biologia molecular. A imunohistoquímica e a sorologia têm pouca aplicação na prática clínica atualmente (12).

Quando o Dr. Georges Papanicolaou criou a citologia, no final da década de 1920, seu objetivo era apenas avaliar as alterações endócrinas no trato genital feminino (84). O primeiro diagnóstico citológico de câncer foi feito, por acaso, em 1925, em uma funcionária do New York Women's Hospital (63). Naquela época, o mentor da citologia não podia imaginar o enorme potencial do método que acabara de criar. Esse método permite, além do diagnóstico de câncer, a identificação do efeito citopático do HPV (coilocitose) e, ainda, o que é mais importante, das transformações celulares pré-neoplásicas causadas pelos HPVs oncogênicos. Como o HPV é encontrado em praticamente todos os casos de carcinoma ou de lesões pré-neoplásicas, um diagnóstico citológico de carcinoma ou de lesão intra-epitelial significa, também, um diagnóstico de infecção por HPV (105).

No que tange à histopatologia, é um método que permite um diagnóstico preciso das lesões pré-neoplásicas. Existem, entretanto, lesões de difícil interpretação, principalmente aquelas que exibem alterações discretas, ou que se apresentam associadas à atrofia ou à regeneração epitelial (42, 67).

Além desses métodos convencionais, há vários métodos disponíveis de biologia molecular, como southern blotting, dot blot, hibridização *in situ* com filtro (FISH), hibridização *in situ*, PCR e captura híbrida. Os dois últimos mostram alta sensibilidade e especificidade, embora a PCR apresente ainda problemas em relação à padronização da técnica e à automação (Quadro I). Por permitirem a tipagem viral, essas duas últimas técnicas têm contribuído muito na identificação dos tipos virais considerados de alto risco, ou seja, aqueles encontrados em carcinomas (87). A captura híbrida é capaz ainda de determinar

a carga viral, que, quando elevada, é associada a um maior risco de desenvolvimento de lesão intra-epitelial e de câncer (87).

Quadro 1. Características das principais técnicas de biologia molecular para diagnóstico de infecção por HPV

Baixa sensibilidade e/ou especificidade
Hibridização <i>in situ</i>
Hibridização <i>in situ</i> com filtro (FISH)
Dot blot
Captura híbrida I
Execução complexa e/ou baixo potencial para execução automatizada
Hibridização <i>in situ</i>
Hibridização <i>in situ</i> com filtro (FISH)
Southern blot
Captura híbrida I
Alta sensibilidade e especificidade
PCR
Captura híbrida II
Adequada para aplicação automatizada e em larga escala
PCR (<i>primers</i> de consenso)
Captura híbrida II

Diagnóstico precoce e estratégias de prevenção do câncer cervical

Não existem dúvidas de que programas de prevenção bem organizados, baseados em citologia, têm sido efetivos em reduzir a incidência de câncer cervical e a mortalidade dele advinda. Há um potencial de redução de incidência de 60 a 90%, em três anos após o início da triagem e do tratamento das lesões pré-neoplásicas (1, 22, 72). Todavia, o grande sucesso e a drástica redução da incidência do câncer cervical trouxeram consigo uma consequência paradoxal. Passaram a merecer a atenção não apenas do meio médico, mas também da imprensa leiga, os casos falso-negativos da citologia (45). Há relatos de 47% de cânceres invasores em mulheres com triagem citológica aparentemente adequada (72). Uma redução ainda maior na incidência da doença provavelmente requeira a adoção de um conjunto de medidas que possibilitem uma identificação mais acurada das lesões precursoras.

A eficiência e a conveniência dos métodos de biologia molecular levaram muitos a considerar seriamente sua utilização (principalmente a da captura híbrida) em programas de prevenção do câncer cervical, até mesmo com potencial para substituir a triagem citológica (47). A favor dessa opinião há os relatos de que a detecção de HPV-DNA, e principalmente de infecção persistente por HPV do grupo de alto risco, em pacientes com citologia normal, estaria associada a um risco relativo aumentado de câncer cervical, em decorrência de controles com citologia e HPV-DNA negativos (97,103).

Estudos epidemiológicos demonstram que um teste positivo para HPV-DNA de alto risco é o fator de risco independente mais poderoso para o desenvolvimento de lesões intra-epiteliais e de câncer invasor (49). Os dados indicam que um teste de HPV negativo, com sensibilidade adequada, colocaria a paciente em um risco tão baixo que a triagem citológica não seria justificável (31). A captura híbrida teria a capacidade de fornecer essa segurança, uma vez que tem sensibilidade e valor preditivo negativo próximos de 100% e valor preditivo positivo de 66,7% (49).

É certo que os métodos de biologia molecular são úteis no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer cervical. Seu papel, entretanto, ainda está por ser definido. Várias considerações a esse respeito devem ser feitas. Uma delas é a de que, sendo o HPV encontrado em todos os carcinomas e lesões precursoras, a prevalência geral do vírus na população é bastante alta (cerca de 20% nos Estados Unidos) (85). Vale lembrar que HPVs do grupo de alto risco são detectados em até 14% de mulheres normais, ou seja, naquelas que não possuem carcinoma nem lesão pré-neoplásica; portanto, se nosso objetivo final é o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas (lesões de alto grau), e não o de infecção viral, não se pode perder de vista que a aplicação em massa de testes como a captura híbrida implica a obtenção de uma taxa bastante alta de falso-positivos, na medida em que detecta até 14% de pacientes com vírus, mas sem lesão (13, 47). Essas pacientes, além de sofrerem com o estigma de um diagnóstico de doença sexualmente transmissível, com risco para câncer, poderiam ser levadas a procedimentos diagnósticos e terapêuticos desnecessários, como a colposcopia (31).

Em um estudo realizado na cidade de São Paulo em 1998, incluindo 1.430 mulheres, a prevalência de HPV foi de 13,8%, pela técnica de PCR (28). A prevalência do vírus varia muito de acordo com a idade. Em mulheres jovens e sexualmente ativas, HPV-DNA pode ser encontrado em até 70% das pacientes (39). Nessas, a maioria das infecções é transitória, nem sempre levando ao desenvolvimento de lesões intra-epiteliais e raramente levando à infecção persistente (88, 99). A partir dos 35 anos, a prevalência de lesões de alto grau se reduz, e após os 50 anos a frequência de infecção por HPV é baixa. Nessa última faixa etária, todavia, há alguns fatores que contribuem para aumentar a taxa de falso-negativos da citologia (37, 49).

As propostas de utilização racional da pesquisa viral na prevenção do câncer cervical devem levar em consideração esses fatores e, talvez, eleger populações e situações específicas em que a citologia e a pesquisa viral possam ser usadas em conjunto. Dentre as várias propostas estão desde aquelas mais radicais, que propõem a adoção da pesquisa viral como o método único de triagem (13, 47), até aquelas que sugerem o seu uso como método auxiliar nos casos de dúvida na interpretação do exame citológico (6, 18) ou no caso de mulheres com lesões de baixo grau, direcionando à colposcopia apenas aquelas com vírus do grupo de alto risco (2, 74).

Considerando que pacientes com um diagnóstico citológico de atipias escamosas de significado indeterminado (ASCUS) são frequentemente direcionadas à colposcopia, a pesquisa viral poderia ser usada eficientemente para encaminhar a esse exame apenas aquelas que tivessem teste positivo (HPV do grupo de alto risco) (78, 94). Segundo o atual consenso, a conduta preconizada para as pacientes com ASCUS na citologia depende de como o teste for subcategorizado, ou seja, células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), ou células escamosas atípicas em que não seja possível afastar lesão de alto grau (ASC-H). Mulheres com ASC-US poderiam ser avaliadas mediante um programa que consistisse na coleta de duas citologias repetidas, colposcopia imediata ou teste de DNA, sendo esse o preferido em caso de triagem anterior pela citologia líquida. As pacientes com ASC-H, lesão de baixo ou alto grau, deveriam ser imediatamente encaminhadas à colposcopia (101). Existem ainda alterações citológicas menores, como a paraqueratose, que não são suficientes para um diagnóstico de lesão de baixo grau, nem se enquadram nos critérios de ASCUS, mas têm sido relacionadas a um maior índice de lesões de baixo grau na biópsia (104). A pesquisa viral poderia ser aplicada, auxiliando na elucidação desses casos, que são frequentes na prática diária.

Um trabalho com metodologia de simulação em computador, com base em dados da história natural do câncer cervical, concluiu que o máximo em ganho de anos de vida com o menor custo seria conseguido mediante a combinação da triagem por pesquisa viral e da citologia a cada dois anos, sem limite superior de idade. Esse mesmo trabalho afirma ainda que, se o preço da captura híbrida fosse reduzido a US\$ 5, ela passaria a ser o método de eleição (51). Um problema em relação ao mesmo trabalho foi o fato de ter considerado o diagnóstico de ASCUS como negativo, o que reduz bastante a sensibilidade da citologia, favorecendo ao mesmo tempo a pesquisa viral.

Diagnóstico clínico baseado em técnicas de visualização

Há vários métodos propostos para auxiliar na triagem do câncer cervical, com a finalidade de diminuir o número de falso-negativos pela citologia. Entre esses estão desde os mais simples, como a inspeção visual direta (IVD), até métodos complexos capazes de melhorar a visualização direta do colo, como a cervicografia, ou métodos biofísicos, como a sonda polar (polarprobe) (68).

A IVD consiste em lavar o colo uterino com uma solução de ácido acético (vinagre) e então inspecioná-lo a olho nu, ou com uma lente de aumento, na tentativa de identificar áreas acetobranças, que frequentemente correspondem a lesões intra-epiteliais. Esse método está sendo avaliado como uma alternativa à citologia em regiões com baixos recursos financeiros. Alguns trabalhos têm mostrado que a IVD possui uma sensibilidade semelhante à da

citologia, mas com baixa especificidade (102). Outro método de visualização direta é a especuloscopia. Essa é uma variação da colposcopia que combina a aplicação de ácido acético de uma luz quimioluminescente azul-branca, para exame do colo. Há relatos de que, associada à citologia, a especuloscopia aumenta a detecção de lesões cervicais (8).

A cervicografia é uma fotografia padronizada do colo uterino, a qual fornece duas imagens que serão analisadas em centros de referência por colposcopistas especializados. Os estudos que a avaliaram atribuem a ela sensibilidade maior que a da citologia (17, 62).

A sonda polar (polarprobe) é um dispositivo portátil optoeletrônico que diferencia tecidos com base em suas características elétricas e ópticas. O dispositivo é aplicado diretamente ao colo, e a leitura é feita com o auxílio de um computador portátil (68). Há poucos trabalhos disponíveis, mas estes apontam razoável concordância com a colpo-histologia (16, 79).

O diagnóstico histológico e suas limitações

A histologia é considerada a base para o tratamento e seguimento de alterações identificadas pela citologia, além de representar o padrão-ouro nos estudos de patologia cervical. Entretanto, vários fatores contribuem para a ocorrência de variações diagnósticas entre observadores, principalmente nos casos com alterações mais discretas (65). Em um estudo de 124 espécimes de biópsia, avaliados por 5 patologistas, o diagnóstico variou de benigno à displasia em 52% dos casos (33). Dentre os fatores que colaboram para essa variação encontram-se a aplicação inconsistente de critérios diagnósticos e a existência de alterações que simulam lesões pré-neoplásicas glandulares e escamosas (24, 25, 70).

Tem sido proposta a utilização de marcadores biológicos, Ki-67, ciclina E e p16^{ink4} (65, 73) para auxiliar na classificação das lesões cervicais pré-neoplásicas e em sua distinção das alterações epiteliais não neoplásicas. Esses marcadores têm como vantagem sobre a detecção viral o fato de apontarem transformação celular e não apenas infecção viral. O antígeno de proliferação celular Ki-67, identificado pelo anticorpo MIB-1, é capaz de realçar células em atividade de replicação. Ele é normalmente expresso em células das camadas basal e parabasal do epitélio escamoso. Em epitélios displásicos, entretanto, pode haver células positivas em camadas mais superficiais (65). Por sua vez, a superexpressão do p16^{ink4} (um inibidor de cinase dependente da ciclina) parece ser um bom marcador de ativação desregulada induzida pelos oncogenes E6 e E7 do HPV (43). A oncoproteína E7 inativa o pRb, que é inibidor da transcrição do gene p16^{ink4}, levando assim a sua superexpressão (44).

A utilização dos marcadores biológicos pode ser de grande utilidade nos casos de dúvida diagnóstica, mostrando vantagens sobre a detecção viral por métodos como a CH, que, se usada nesses casos, terá de ser colhida após a realização da biópsia. A obediência a esse critério, ao avaliar a concor-dância entre os resultados da CH e de biópsias (segunda parte desta dissertação), constituiu o principal fator associado à CH negativa, em pacientes com diagnóstico histológico de LIE. A detecção viral por PCR não apresentaria essa limitação, por poder ser aplicada ao material do bloco de parafina. Seu custo, todavia, é bastante superior ao dos marcadores imuno-histoquímicos.

Vacina

Uma vacina anti-HPV eficaz eliminaria virtualmente a necessidade de um programa de triagem citológica ou por outros métodos, o que constituiria uma das maiores vitórias já conseguidas na luta contra o câncer. Um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de tal vacina era a falta de uma fonte abundante de antígenos virais, uma vez que não há um sistema apropriado para o cultivo do HPV. Hoje, entretanto, alguns avanços e o grande esforço que vem sendo empreendido indicam que o desenvolvimento de uma vacina anti-HPV pode ser uma perspectiva real em um futuro próximo. Através de métodos recombinantes, por exemplo, são produzidas as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral (15, 29, 30, 38, 56). Embora todas as proteínas virais tenham potencial para ser usadas em uma vacina, essas duas seriam suficientes para evocar a produção de anticorpos neutralizantes. Uma vacina composta pela proteína principal L1 do capsídeo viral está atualmente em teste (fases I e II) (15).

Recentemente foi encontrada, em doadores saudáveis de sangue, alta frequência de células T-helper de memória específicas para a proteína E2 do HPV, o que sugere a possibilidade de um *boosting* dessa imunidade para fins terapêuticos ou preventivos (23).

Vacinas baseadas nas oncoproteínas E6 e E7 provaram ser imunogênicas, mas a sua eficácia não pode ainda ser demonstrada em ensaios clínicos (81). Essas vacinas têm a finalidade de induzir a resposta imune citotóxica CD8⁺, que lisa células infectadas ou suprime expressão de RNA viral. Em um estudo pré-clínico, modelos de tumores expressando HPV 16 foram eliminados com uma vacina baseada em peptídios longos derivados da proteína E7 (108).

Uma vacina contra o HPV 16 foi testada em um grupo de 2.392 mulheres jovens nos Estados Unidos. Metade das pacientes recebeu a vacina, e a outra metade, placebo. Entre as mulheres que receberam apenas placebo, a incidência de infecção persistente pelo HPV 16 foi de 3,8 por 100 mulheres/ano, enquanto no grupo que recebeu a vacina não houve incidência (eficácia de 100%) (46).

Caso esses avanços se concretizem, poder-se-á considerar seriamente a possibilidade de que um dia o câncer de colo uterino seja erradicado.

O novo Papanicolaou

O exame de Papanicolaou permanece praticamente sem inovações técnicas desde sua introdução, apesar de tentativas de melhora da técnica citológica, como o uso de produtos que causam despolimerização química do muco cervical (83) e um método de sedimentação por velocidade (61) ou outro por lavagem em pulso (60). Há cerca de dez anos, surgiu a técnica da citologia baseada em meio líquido, em que o material colhido com uma escova é colocado em um líquido preservativo. Uma monocamada de células é então depositada na lâmina sobre uma suspensão. O esfregaço preparado por essa técnica teria melhor representatividade com menos material de fundo na lâmina, o que facilitaria a avaliação e tornaria a análise mais confiável e mais rápida (35). Entre os produtos atualmente disponíveis no mercado para a utilização na citologia líquida estão: AutoCytePrep, CYTOSCREEN, LABONORD, ThinPrep e Dna Citoliq.

A citologia líquida tem ganhado cada vez mais espaço, sendo utilizada em larga escala em alguns centros. Sua avaliação, entretanto, em comparação com a citologia convencional, ainda é motivo de discussão, havendo os defensores fervorosos e os céticos (55).

Sabendo-se que a citologia é um método de triagem de câncer cervical, é indispensável lembrar que o melhor parâmetro para avaliar uma nova técnica de triagem da doença seria averiguar se ela é capaz de reduzir a incidência, morbidade e/ou mortalidade pela neoplasia. Se essas informações ainda não estão disponíveis, então outras podem ser utilizadas, como aquelas que dizem respeito à melhora na sensibilidade, com detecção de mais lesões precursoras. Isso, entretanto, só levará à melhora das avaliações de resultado anteriormente citadas, se a detecção adicional resultar em tratamento precoce, em um intervalo que reduza a incidência, a morbidade e/ou a mortalidade. Não pode ser automaticamente inferido que a detecção mais precoce resultará em melhora nas medidas de resultado (64). Outros fatores a serem considerados são a melhora na especificidade, que diminuiria a necessidade de repetição dos testes, e a redução no tempo de exame das lâminas. Quanto ao índice de câncer invasor ou de mortalidade, não há ainda na literatura estudos randomizados que o incluam como parâmetro de avaliação (64).

A maioria dos estudos compara a sensibilidade da citologia em meio líquido com a da citologia convencional, usando a avaliação histológica como padrão-ouro. Existem, entretanto, algumas evidências de que a citologia líquida possa reduzir a proporção de espécimes inadequados, melhorar a sensibilidade do teste e reduzir o seu tempo de interpretação (80). Os estudos que utilizam modelos em computador sugerem que a citologia líquida, por essas vantagens apresentadas, possa contribuir para o diagnóstico precoce do câncer invasor e assim reduzir sua incidência (64). Esse método oferece ainda a possibilidade de

utilização de marcadores como o p16^{ink4} no material citológico nos casos de dificuldade diagnóstica (7).

CONCLUSÃO

O conhecimento a respeito do câncer de colo uterino e de seu agente etiológico, o HPV, avançou de maneira impressionante nos últimos anos, principalmente em decorrência da utilização de técnicas de biologia molecular. Entretanto, um exame simples, barato e existente há mais de cinquenta anos – a citologia – permanece como o principal avanço até hoje, no combate a essa doença, tendo reduzido drasticamente sua incidência e a conseqüente mortalidade. Infelizmente, porém, esse exame, não foi suficiente para eliminar o câncer de colo uterino. Entretanto, nos Estados Unidos, a maior parte das mulheres que realizam citologias periódicas, como parte de um programa de prevenção regular, está livre do câncer cervical. Ainda assim, mesmo naquele país, a utilização de métodos de triagem mais sensíveis ou a melhora da sensibilidade da citologia teriam efeito limitado, além de restrito a essa parcela menor da população (85).

Em países como o Brasil, uma fração ainda menor da população é adequadamente triada. Dessa maneira, os recursos escassos reservados aos programas de prevenção talvez fossem mais bem aproveitados se destinados à triagem da população pela citologia convencional, que é ainda o método mais barato e de comprovada eficácia na redução da mortalidade advinda do câncer cervical (por permitir o tratamento das lesões pré-neoplásicas). Já o emprego em massa de testes de biologia molecular, em uma população como a do Brasil, provavelmente retornaria um número tão grande de resultados positivos, que a sua investigação diagnóstica consumiria boa parte dos recursos disponíveis à saúde pública. Cumpre ressaltar ainda que, em uma grande parcela das pacientes com teste de detecção viral positivo e, conseqüentemente, submetidas a todo o processo de investigação diagnóstica (citologia, colposcopia e biópsia, por exemplo), nenhuma lesão seria encontrada. Quanto à citologia em meio líquido poderá ser uma alternativa excelente, caso seus custos sejam reduzidos. Uma das vantagens desse método é unir o melhor das duas técnicas, permitindo a realização da CH e de marcadores imuno-histoquímicos (como o p16^{ink4}) nos casos de dúvida na interpretação citológica, sem a necessidade de nova coleta.

O diagnóstico histopatológico das lesões pré-neoplásicas, que é a principal referência para a orientação da conduta terapêutica, além de representar o padrão-ouro em estudos que avaliam outros métodos diagnósticos, apresenta, na interpretação, dificuldades para as quais nem sempre os patologistas e outros especialistas estão alertas. Nessas situações de dificuldade, o emprego de marcadores imuno-histoquímicos, como o p16^{ink4} e o Ki-67 (MIB-1), poderia aumentar a acurácia diagnóstica do exame histopatológico.

A alternativa para a superação desses métodos seria o desenvolvimento de uma vacina contra o HPV, uma perspectiva real para os próximos anos. Ela constituiria um marco na história do combate ao câncer, estando as populações mais pobres certamente entre as mais beneficiadas.

ABSTRACT

HPV and cervical cancer

Cervical cancer is a good example in oncology, of a preventable neoplasm. Since 1920, when Dr. Georges Papanicolaou created cytology, large screening programs largely reduced its incidence. Even though, cervical cancer still represents 12% of all female tumors. The well established viral etiology (HPV - *human papillomavirus*) and the great advances in molecular biology, provide new possibilities of better and earlier diagnosis through viral detection, by techniques such as hybrid capture. The anti-HPV vaccine is very promising as a new weapon expected for the next coming years.

KEYWORDS: Cervix cancer. Human papillomavirus. Oncogenesis. Prevention and control.

REFERÊNCIAS

1. Anonymous. Screening for squamous cervical cancer—the duration of low risk following negative results in cervical cytology test: introduction. IARC Working Group on Cervical Cancer Screening. *IARC Sci Publ*: 15-24, 1986.
2. Anonymous. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst* 92: 397-402, 2000.
3. Acladius NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M and Kitchener H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer* 98: 435-439, 2002.
4. Aurelian L. Herpesvirus hominis: from latency to carcinogenesis? *Johns Hopkins Med J Suppl* 2: 245-266, 1973.
5. Barrasso R. HPV viral typing. *Gynecol Obstet Fertil* 28: 189, 2000.
6. Bergeron C, Jeannel D, Poveda J, Cassonnet P and Orth G. Human papillomavirus testing in women with mild cytologic atypia. *Obstet Gynecol* 95: 821-827, 2000.
7. Bibbo M, DeCecco J and Kovatich AJ. P16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 25: 8-11, 2003.
8. Boselli F, De Martis S, Rivasi F, Toni A, Abbiati R and Chiossi G. The Italian experience of a Pap test and speculoscopy based screening programme. *J Med Screen* 7: 160-162, 2000.
9. Brandt-Rauf PW. Biomarkers of gene expression: growth factors and oncoproteins. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 4): 807-816, 1997.
10. Brooks LA, Sullivan A, O'Nions J, Bell A, Dunne B, Tidy JA, Evans DJ, Osin P, Vousden KH, Gusterson B, Farrell PJ, Storey A, Gasco M, Sakai T and Crook T. E7

- proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 86: 263-268, 2002.
11. Cheah PL and Looi LM. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol* 20: 1-10, 1998.
 12. Cho NH, Joo HJ, Ahn HJ, Jung WH and Lee KG. Detection of human papillomavirus in warty carcinoma of the uterine cervix: comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization and in situ polymerase chain reaction methods. *Pathol Res Pract* 194: 713-720, 1998.
 13. Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C and Birembaut P. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 84: 1616-1623, 2001.
 14. Clement PB and Scully RE. Carcinoma of the cervix: histologic types. *Semin Oncol* 9: 251-264, 1982.
 15. Connett H. HPV vaccine moves into late stage trials. *Nat Med* 7: 388, 2001.
 16. Coppleson M, Reid BL, Skladnev VN and Dalrymple JC. An electronic approach to the detection of pre-cancer and cancer of the uterine cervix: a preliminary evaluation of Polarprobe. *Int J Gynecol Cancer* 4: 79-83, 1994.
 17. Costa S, Sideri M, Bucchi L, Schettino F, Maini I, Spinaci L, Bovicelli L and Terzano P. Cervicography and HPV DNA testing as triage criteria for patients with abnormal pap smear. *Gynecol Oncol* 71: 404-409, 1998.
 18. Costa S, Sideri M, Syrjanen K, Terzano P, De Nuzzo M, De Simone P, Cristiani P, Finarelli AC, Bovicelli A, Zamparelli A and Bovicelli L. Combined Pap smear, cervicography and HPV DNA testing in the detection of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Acta Cytol* 44: 310-318, 2000.
 19. Cotran RS, Kumar V, Collins T and Robbins SL, *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. 1999, Philadelphia: Saunders. xv, 1424.
 20. Crum CP. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 13: 243-251, 2000.
 21. Curado MP, *Câncer em Goiânia: Tendências (1988 - 1997)*. 1 ed. 2000, Goiânia. 108.
 22. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M and van den Akker E. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess* 3: i-iv, 1-196, 1999.
 23. de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, van Meijgaarden KE, Drijfhout JW, Kenter G, Vermeij P, Melief CJ and Offringa R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 62: 472-479, 2002.
 24. de Vet HC, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee WS, Willebrand D, Sturmans F and Arends JW. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 43: 1395-1398, 1990.
 25. de Vet HC, Knipschild PG, Schouten HJ, Koudstaal J, Kwee WS, Willebrand D, Sturmans F and Arends JW. Sources of interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. *J Clin Epidemiol* 45: 785-790, 1992.
 26. Feuerhake F, Sigg W, Hofter EA, Unterberger P and Welsch U. Cell proliferation, apoptosis, and expression of Bcl-2 and Bax in non-lactating human breast epithelium in relation to the menstrual cycle and reproductive history. *Breast Cancer Res Treat* 77: 37-48, 2003.
 27. Finzer P, Aguilar-Lemarroy A and Rosl F. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett* 188: 15-24, 2002.
 28. Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M and Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. *Rev Panam Salud Publica* 6: 223-233, 1999.

29. Garnett GP and Waddell HC. Public health paradoxes and the epidemiological impact of an HPV vaccine. *J Clin Virol* 19: 101-111, 2000.
30. Gavarasana S, Kalasapudi RS, Rao TD and Thirumala S. Prevention of carcinoma of cervix with human papillomavirus vaccine. *Indian J Cancer* 37: 57-66, 2000.
31. Giard RW and Coebergh JW. [Population screening for cervical cancer; eventual gain not expected to increase by testing for papillomavirus]. *Ned Tijdschr Geneesk* 144: 1.664-1.668, 2000.
32. Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR and Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75: 7.583-7.591, 2001.
33. Grenko RT, Abendroth CS, Frauenhoffer EE, Ruggiero FM and Zaino RJ. Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Clin Pathol* 114: 735-740, 2000.
34. Hausen ZH. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J. National Cancer Institute* 92: 690 - 695, 2000.
35. Herbert A. Liquid-based cytology. *Cytopathology* 13: 382-383, 2002.
36. Hickman ES, Bates S and Vousden KH. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. *J Virol* 71: 3.710-3.718, 1997.
37. Hill RM and Dunn PJ. On the "irreducible false negative rate" in cervical cytology. *Diagn Cytopathol* 15: 184, 1996.
38. Hilleman MR. Overview of vaccinology with special reference to papillomavirus vaccines. *J Clin Virol* 19: 79-90, 2000.
39. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ and Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338: 423-428, 1998.
40. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T and Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* 277: 2.923-2.930, 2002.
41. Jeon S and Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1.654-1.658, 1995.
42. Jovanovic AS, McLachlin CM, Shen L, Welch WR and Crum CP. Postmenopausal squamous atypia: a spectrum including "pseudo-koilocytosis". *Mod Pathol* 8: 408-412, 1995.
43. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K and Crum CP. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 25: 884-891, 2001.
44. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92: 276-284, 2001.
45. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 261: 737-743, 1989.
46. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM and Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 347: 1.645-1.651, 2002.
47. Kuhn L, Denny L, Pollack A, Lorincz A, Richart RM and Wright TC. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource settings. *J Natl Cancer Inst* 92: 818-825, 2000.
48. Levert M, Clavel C, Graesslin O, Masure M, Birembaut P, Quereux C and Gabriel R. Human papillomavirus typing in routine cervical smears. Results from a series of 3778 patients. *Gynecol Obstet Fertil* 28: 722-728, 2000.

49. Lin CT, Tseng CJ, Lai CH, Hsueh S, Huang HJ and Law KS. High-risk HPV DNA detection by Hybrid Capture II. An adjunctive test for mildly abnormal cytologic smears in women \geq 50 years of age. *J Reprod Med* 45: 345-350, 2000.
50. Maciag PC and Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res* 32: 915-922, 1999.
51. Mandelblatt JS, Lawrence WF, Womack SM, Jacobson D, Yi B, Hwang YT, Gold K, Barter J and Shah K. Benefits and costs of using HPV testing to screen for cervical cancer. *JAMA* 287: 2.372-2.381, 2002.
52. McGlennen RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 20: 383-406, 2000.
53. Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV and Turgeon H. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol* 25: 7-16, 1981.
54. Moore TO, Moore AY, Carrasco D, Vander Straten M, Arany I, Au W and Tying SK. Human papillomavirus, smoking, and cancer. *J Cutan Med Surg* 5: 323-328, 2001.
55. Moseley R. Is it reality or an illusion that liquid-based cytology is better than conventional cervical smears? *Cytopathology* 13: 135-136, 2002.
56. Muderspach L, Wilczynski S, Roman L, Bade L, Felix J, Small LA, Kast WM, Fascio G, Marty V and Weber J. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res* 6: 3406-3416, 2000.
57. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM and Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421, 1989.
58. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19: 1-5, 2000.
59. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ and Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359: 1.093-1.101, 2002.
60. Naslund I, Auer G, Pettersson F and Sjovall K. The pulse wash instrument. A new sampling method for uterine cervical cancer detection. *Am J Clin Oncol* 9: 327-333, 1986.
61. Neugebauer D, Otto K and Soost HJ. Numerical analysis of cell populations in smear and monolayer preparations from the uterine cervix. I. The proportions of isolated, abnormal epithelial cells in slides from one applicator. *Anal Quant Cytol* 3: 91-95, 1981.
62. Nuovo J, Melnikow J, Hutchison B and Paliescheskey M. Is cervicography a useful diagnostic test? A systematic overview of the literature. *J Am Board Fam Pract* 10: 390-397, 1997.
63. Papanicolaou GN. New cancer diagnosis. In: *Proceedings of the Third Race Betterment Conference*, 1928.
64. Payne N, Chilcott J and McGoogan E. Liquid-based cytology in cervical screening: a rapid and systematic review. *Health Technol Assess* 4: 1-73, 2000.
65. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, DeMattia AE, Chen YT and Isacson C. Diagnostic Accuracy of Cervical Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Is Improved With MIB-1 Immunostaining. *Am J Surg Pathol* 26: 70-75, 2002.
66. Poliseno L, Mariani L, Collecchi P, Piras A, Zaccaro L and Rainaldi G. Bcl2-negative MCF7 cells overexpress p53: implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 50: 127-130, 2002.
67. Prasad CJ, Genest DR and Crum CP. Nondiagnostic squamous atypia of the cervix (atypical squamous epithelium of undetermined significance): histologic and molecular correlates. *Int J Gynecol Pathol* 13: 220-227, 1994.
68. Quek SC, Mould T, Canfell K, Singer A, Skladnev V and Coppleson M. The Polarprobe—emerging technology for cervical cancer screening. *Ann Acad Med Singapore* 27: 717-721, 1998.
69. Riethmuller D, Schaal JP and Mouglin C. Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus. *Gynecol Obstet Fertil* 30: 139-146, 2002.

70. Robertson AJ, Anderson JM, Beck JS, Burnett RA, Howatson SR, Lee FD, Lessells AM, McLaren KM, Moss SM, Simpson JG and et al. Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 42: 231-238, 1989.
71. Rubin E and Farber JL, *Pathology*. 3rd ed. 1999, Philadelphia: Lippincott-Raven. xii, 1664.
72. Sasieni PD, Cuzick J and Lynch-Farmery E. Estimating the efficacy of screening by auditing smear histories of women with and without cervical cancer. The National Co-ordinating Network for Cervical Screening Working Group. *Br J Cancer* 73: 1.001-1.005, 1996.
73. Schneede P. Genital human papillomavirus infections. *Curr Opin Urol* 12: 57-61, 2002.
74. Shlay JC, Dunn T, Byers T, Baron AE and Douglas JM, Jr. Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2-3 using risk assessment and human papillomavirus testing in women with atypia on papanicolaou smears. *Obstet Gynecol* 96: 410-416, 2000.
75. Skegg DC. Oral contraceptives, parity, and cervical cancer. *Lancet* 359: 1.080-1.081, 2002.
76. Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, Bosch FX, Walboomers JM and Peeling RW. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 185: 324-331, 2002.
77. Sokolovskii RM, Zel'dovich DR and Kovnator B. Trichomonas invasion and intraepithelial cancer of the cervix uteri. *Vopr Onkol* 12: 37-43, 1966.
78. Solomon D, Schiffman M and 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* 93: 293-299, 2001.
79. Spitzer M. Cervical screening adjuncts: recent advances. *Am J Obstet Gynecol* 179: 544-556, 1998.
80. Sprenger E, Schwarzmann P, Kirkpatrick M, Fox W, Heinzerling RH, Geyer JW and Knesel EA. The false negative rate in cervical cytology. Comparison of monolayers to conventional smears. *Acta Cytol* 40: 81-89, 1996.
81. Stanley MA. Human papillomavirus vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 4: 15-22, 2002.
82. Sterling JC and Tyring SK, *Human papillomaviruses: clinical and scientific advances*. 1st. ed. 2001, London: Arnold. p.10-18.
83. Steven FS, Palcic B, Sin J and Desai M. A simple clinical method for the preparation of improved cervical smears-approximating to monolayers. *Anticancer Res* 17: 629-632, 1997.
84. Stockhart CR and Papanicolaou GN. The existence of a typical estrous cycle in the guinea pigs with a study of its histological and physiological changes. *Am J Anat* 22: 225-283, 1917.
85. Stoler MH. Advances in cervical screening technology. *Mod Pathol* 13: 275-284, 2000.
86. Stoler MH. HPV for cervical cancer screening: is the era of the molecular pap smear upon us? *J Histochem Cytochem* 49: 1.197-1.198, 2001.
87. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP and Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 76: 41-47, 2002.
88. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ and Wright TC, Jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 337: 1343-1349, 1997.
89. Syrjanen K, Vayrynen M, Castren O, Mantyjarvi R, Pyrhonen S and Yliskoski M. Morphological and immunohistochemical evidence of human papilloma virus (HPV) involvement in the dysplastic lesions of the uterine cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 21: 261-269, 1983.
90. Tenti P, Romagnoli S, Silini E, Zappatore R, Spinillo A, Giunta P, Cappellini A, Vesentini N, Zara C and Carnevali L. Human papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix: PCR analysis of 138 cases and correlation with histologic type and grade. *Am J Clin Pathol* 106: 52-56, 1996.

91. Tindle RW, Herd K, Doan T, Bryson G, Leggatt GR, Lambert P, Frazer IH and Street M. Nonspecific down-regulation of CD8+ T-cell responses in mice expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from the keratin-14 promoter. *J Virol* 75: 5.985-5.997, 2001.
92. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Rev Cancer* 2: 59-65, 2002.
93. Van Ranst M, Kaplan JB and Burk RD. Phylogenetic classification of human papillomaviruses: correlation with clinical manifestations. *J Gen Virol* 73: 2.653-2.660, 1992.
94. Vassilakos P, de Marval F, Munoz M, Broquet G and Campana A. Human papillomavirus (HPV) DNA assay as an adjunct to liquid-based Pap test in the diagnostic triage of women with an abnormal Pap smear. *Int J Gynaecol Obstet* 61: 45-50, 1998.
95. Vilos GA. Dr. George Papanicolaou and the birth of the Pap test. *Obstet Gynecol Surv* 54: 481-483, 1999.
96. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19, 1999.
97. Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, Hallmans G and Dillner J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 341: 1633-1638, 1999.
98. Werness BA, Levine AJ and Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18-E6 proteins with p53. *Science* 248: 76-79, 1990.
99. Wheeler CM, Greer CE, Becker TM, Hunt WC, Anderson SM and Manos MM. Short-term fluctuations in the detection of cervical human papillomavirus DNA. *Obstet Gynecol* 88: 261-268, 1996.
100. Woodward TA, Klingler PD, Genko PV and Wolfe JT. Barrett's esophagus, apoptosis and cell cycle regulation: correlation of p53 with Bax, Bcl-2 and p21 protein expression. *Anticancer Res* 20: 2.427-2.432, 2000.
101. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB and Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 287: 2.120-2.129, 2002.
102. Wright TC, Jr., Menton M, Myrtle JF, Chow C and Singer A. Visualization techniques (colposcopy, direct visual inspection, and spectroscopic and other visual methods). Summary of task force 7. *Acta Cytol* 46: 793-800, 2002.
103. Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Andersen PK, Sparen P, Gustafsson M, Magnusson P, Ponten J, Gyllensten U and Adami HO. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* 60: 6.027-6.032, 2000.
104. Zahn CM, Askew AW, Hall KL and Barth WH, Jr. The significance of hyperkeratosis/parakeratosis on otherwise normal Papanicolaou smears. *Am J Obstet Gynecol* 187: 997-1001, 2002.
105. Zhang WH, Wu AR, Li JX and Lin YC. [Relation between human papillomavirus (HPV) and cancer of uterine cervix]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 9: 433-435, 1987.
106. Zheng L and Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264: 2-18, 2001.
107. zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 49: 4.677-4.681, 1989.
108. Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, van der Burg SH and Melief CJ. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169: 350-358, 2002.

