

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
(MESTRADO PROFISSIONAL)**

CRISTINI DA LUZ MORETTI BORBA

**ACURÁCIA DO TESTE DE RNA_m HPV COMOPREDITOR
DERECIDIVADE LESÕES INTRAEPITELIAIS DE ALTO GRAU
E CÂNCER DE COLO UTERINO APÓS CONIZAÇÃO:
REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

**CRICIÚMA
2018**

CRISTINI DA LUZ MORETTI BORBA

**ACURÁCIADO TESTE DE RNA_m HPV COMOPREDITOR
DERECIDIVADELEÇÕES INTRAEPITELIAIS DE ALTO GRAU
E CÂNCER DE COLO UTERINO APÓS CONIZAÇÃO:
REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva (Mestrado Profissional) da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês da Rosa

CRICIÚMA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B726a Borba, Cristini da Luz Moretti.

Acurácia do teste de RNAm HPV como preditor de recidiva de lesões intraepiteliais de alto grau e câncer de colo uterino após conização: revisão sistemática e metanálise / Cristini da Luz Moretti Borba. - 2018.

70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Criciúma, 2018.

Orientação: Maria Inês da Rosa.

1. Teste de RNA Mensageiro. 2. Papilomavírus. 3. Lesão intraepitelial de alto grau. 4. Câncer cervical. 5. Colo uterino – Câncer - Diagnóstico. I. Título.

CDD 23. ed. 616.0756



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria Acadêmica

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva - (Mestrado Profissional)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 31, De 26.01.2016

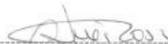
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós Graduação em Saúde Coletiva (Mestrado Profissional) reuniram-se para realizar arguição da defesa de Mestrado apresentada pela candidata **Cristini da Luz Moretti Borba** sob o título “ACURÁCIA DO TESTE DE RNAM HPV COMO PREDITOR DE RECIDIVA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS DE ALTO GRAU E CÂNCER DE COLO UTERINO APÓS CONIZAÇÃO” para a obtenção do grau de Mestre em Saúde Coletiva do Curso de Pós Graduação em Saúde Coletiva (Mestrado Profissional) da Universidade do extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” na dissertação com conceito: A.

Criciúma, SC, 14 de setembro de 2018.

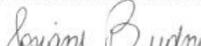
Assinatura Membros da Banca Examinadora:



Profa. Dra. MARIA INÊS DA ROSA (Orientadora)



Profa. Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI (Membro/PPGSCol/UNESC)



Profa. Dra. JOSIANE BUDNI (Membro Externo/UNESC)

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional associado ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

Nesta importante etapa da minha vida, a da realização desta dissertação, existem muitos a agradecer. A gratidão que tenho parece ser inexpressável. As ordens de nomes que deixo por escrito, não necessariamente é por grau de importância, mesmo porque como estou repleta de bons sentimentos não há como discernir esta ordem com convicção.

À espiritualidade amiga, meus protetores, à Deus...pelas intuições, por ter oportunizado conhecer e usufruir da companhia, da dedicação e dos conhecimentos de todos envolvidos no meu aprendizado.

À Dr^a Maria Inês, que desde o início me aconselhou, mostrou-me o caminho, ensinou-me pacientemente e incentivou a capacidade do aprendizado.

À Doutoranda Ana Cristina Macedo, anjo da guarda na terra. Tua dedicação a minha pessoa e ao nosso trabalho foi mais que um aprendizado de “matéria”, foi lição de vida. É incentivo para que faça aos outros da mesma maneira que fizeste comigo.

Aos demais acadêmicos, orientados pela Dr^a Maria Inês, principalmente a Daniela Vicente Bavaresco, Maria Cecília Manenti e Tamy Colonetti, pelo auxílio fornecido.

Aos membros da banca examinadora do projeto Lisiane Tuon e Antônio José Grande, assim como aos membros da banca examinadora da dissertação Cristiane Damiani e Josiane Budni, pelas contribuições fornecidas.

À Prefeitura Municipal de Criciúma, por auxílio financeiro. Espero que consigamos fazer com que o aprendizado seja usufruído da melhor forma.

À UNESCO por oportunizar a busca de conhecimento.

Aos meus pais: João Moretti Neto e a Mariléa da Luz Moretti, que aceitaram a missão divina de me trazer ao mundo e me educar. Por terem me ensinado o valor do trabalho. É imenso o amor que tenho por vocês e minha gratidão vem muito da convivência que temos.

Ao meu marido e companheiro Marcelo Silvano Borba, por oportunizar-me o crescimento interior, espiritual e dividir comigo todo a sua inteligência e senso crítico. Sou grata a ti por me deixar te amar, por me amar e me dar o Igor.

Ao Igor, que ainda em formação física divide os pensamentos da mãe, conflitos com a correria do trabalhos e estudos e com o desejo em dedicar-se mais ao processo gestacional. Mamãe te ama e agradece por querer vir ao mundo através de mim.

Ao meus demais familiares, irmã e sobrinhas que além dos meus agradecimentos peço desculpas pela ausência, pelas brincadeiras não brincadas.

À equipe de trabalho na Unidade de Referência Saúde da Mulher de Criciúma pela colaboração, pelo compartilhamento de aprendizado e a compreensão da minha ausência.

RESUMO

Introdução: O câncer de colo uterino, apesar de ser uma das patologias malignas de fácil rastreamento e prevenção, ainda é um importante problema na saúde coletiva. É responsável por uma elevada taxa de mortalidade no mundo, com cerca de 265 mil óbitos/ano principalmente em países menos desenvolvidos, nos quais ocorrem em 80% dos casos. **Objetivo:** Avaliar a acurácia do teste de RNAm HPV como preditor para a recorrência de Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau ou câncer em pacientes submetidas a tratamento excisional. **Materias e Métodos:** A revisão sistemática foi realizada fazendo-se uma busca nas bases de dados Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) via Pubmed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Cancer Literature (Cancerlit), SciVerse Scopus (Scopus), Índice Bibliográfico Espanhol em Ciências da Saúde (IBECs) e Excerpta Medical Database (Embase), Cochrane Library, Web of Science e Literatura Cinza por publicações relevantes do ano de 1990 a janeiro de 2018. Foram incluídos estudos longitudinais nos quais as pacientes foram submetidas a conização por lesão precursora de alto grau de câncer de colo uterino, nas quais durante o seguimento semestral foi coletado um teste de RNAm HPV no esfregaço cervical. Todas as pacientes apresentaram o teste padrão-ouro, o histopatológico na linha de base e no seguimento, caso fosse identificada lesão e foram seguidas por um período mínimo de 6 meses. **Resultados:** Um total de 3735 estudos foram identificados. Após a triagem, cinco estudos com 1.148 pacientes preencheram os critérios de inclusão. Os testes de RNAm HPV com o desfecho Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC2+), apresentaram uma sensibilidade combinada de 62,2% (IC 95% 54,5 – 69,5), especificidade combinada de 91,9 (IC 95% 90,0 – 93,5), Odds Ratio Diagnostic (DOR) de 30,2 (IC 95% 9,3 – 98,7) e Área sob a Curva (AUC) de 0,598. Os testes DNA HPV HR utilizando o mesmo desfecho, apresentaram uma sensibilidade combinada de 86,8% (IC 95% 88,5 – 91,6), especificidade combinada de 72,4% (IC 95%: 69,4 – 75,2), DOR de 33,9 (IC 95% 69,0 – 166,5) e AUC de 0,6486. Já a citologia oncológica com o mesmo desfecho anterior apresentou uma sensibilidade agrupada de 71,1% (IC 95% 63,4 – 78,0), especificidade combinada de 87,2% (IC 95%: 84,9–89,3), DOR de 19,5 (IC 95% 9,0 – 42,1) e AUC 0,9292. **Conclusão:** Este estudo sustenta a hipótese atual de que os ensaios de RNAm-HPV são uma ferramenta adequada na triagem secundária do câncer de colo uterino após a conização, principalmente por sua alta especificidade.

Palavras-chave: Teste RNAm HPV. HPV. Lesão Intraepitelial de Alto Grau. Câncer cervical.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer, despite being one of the malignant pathologies of easy screening and prevention, is still an important collective health problem. It is responsible for a high mortality rate in the world, with about 265 thousand deaths/year, mainly in less developed countries, where they occur in 80% of cases. **Objective:** To evaluate the accuracy of the HPV mRNA test as a predictor for the recurrence of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion or cancer in patients undergoing excisional treatment. **Methods:** The systematic review was conducted by searching the databases of Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) by Pubmed, Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (LILACS), Cancer Literature (Cancerlit), SciVerse Scopus (Scopus), Spanish Bibliographical Index in Health Sciences (IBECS) and Excerpta Medical Database (Embase), Cochrane Library, Web of Science and Gray Literature by relevant publications from 1990 to January 2018. We included longitudinal studies in which patients were submitted to conization for precursor High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, in which during a semestral follow-up an HPV mRNA test was collected in the cervical smear. All patients presented the gold standard, baseline histopathological and follow-up if lesion was identified and followed for a minimum period of 6 months. **Results:** A total of 3.735 studies were identified. After screening, five studies with 1.148 patients met the inclusion criteria. HPV mRNA tests with Cervical Intraepithelial Neoplasia 2+ (CIN 2+), showed a combined sensitivity of 62.2% (95% CI 54.5-69.5), combined specificity of 91.9 (95% CI 95%, 0 - 93.5), Odds Ratio Diagnostic (DOR) of 30.2 (95% CI 9.3 - 98.7) and Area Under the Curve (AUC) of 0.598. PV HR DNA tests using the same outcome showed a combined sensitivity of 86.8% (IC 95% 88.5 - 91.6), combined specificity of 72.4% (95% CI: 69.4 - 75, 2), DOR of 33.9 (95% CI 69.0 - 166.5) and AUC of 0.6486. HPV HR DNA tests using the same outcome showed a combined sensitivity of 86.8% (IC 95% 88.5 - 91.6), combined specificity of 72.4% (95% CI: 69.4-75, 2), DOR of 33.9 (95% CI 69.0 - 166.5) and AUC of 0.6486. Already, oncotic cytology with the same prior outcome had a pooled sensitivity of 71.1% (95% CI 63.4 - 78.0), combined specificity of 87.2% (95% CI: 84.9-89.3), DOR of 19.5 (95% CI 9.0 - 42.1) and AUC 0.9292.

Keywords: HPV mRNA test. HPV. High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. Cervical cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	25
Figura 2 - Representação do ciclo celular e ação da p53 e pRb.....	27
Figura 3 - História Natural da carcinogênese de colo uterino.....	28
Figura 4 – Chances de regressão espontânea ou progressão para câncer das NIC.....	29
Figura 5 -Tratamento excisionais: A: Conização com bisturi a frio e B: Conização com bisturi de alta frequência.....	36
Figura 6 - Fluxograma da estratégia de busca e seleção dos estudos...	46
Figura 7 - Resultado da avaliação de cada estudo de acordo com o QUADAS-2.....	49
Figura 8 - Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste RNAm HPV.....	51
Figura 9 - Gráfico Floresta da Especificidade dos estudos do teste RNAm HPV.	51
Figura 10 - Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste RNAm HPV	52
Figura 11 - Curva SROC do teste RNAm HPV nos estudos.....	52
Figura 12 - Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste DNA HPV HR.	53
Figura 13 - Gráfico floresta da especificidade dos estudos do teste DNA HPV HR.	54
Figura 14 - Gráfico floresta da DOR dos estudos do teste DNA HPV HR.	54
Figura 15 - Curva SROC dos estudos do teste DNA HPV HR.	55
Figura 16 - Gráfico floresta da sensibilidade dos estudos da citologia oncótica.	56
Figura 17 - Gráfico floresta da especificidade dos estudos da citologia oncótica.	56
Figura 18 – Gráfico de floresta da DOR dos estudos da citologia oncótica.	57
Figura 19 - Curva SROC da citologia dos estudos da citologia oncótica.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática	48
Tabela 2 - Tabela de contingência agrupada do teste RNAm HPV.....	50
Tabela 3 - Tabela de contingência agrupada do teste DNA HPV nos estudos.....	53
Tabela 4 - Tabela de contingência agrupada citologia oncótica nos estudos.....	55
Tabela 5 - Acurácia do teste RNAm HPV para detecção de NIC em histopatológico,comparada com teste de DNA e citologia.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASC-US - Alterações Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado possivelmente não-neoplásicas (do inglês, *Atypical Squamous Cells Of Undetermined Significance*)
- AUC - Área Sob Curva
- Cancerlit - Cancer Literature
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- DOR - Odds Ratio Diagnóstica (do inglês, *Odds Ratio Diagnostic*)
- E – Região precoce (do inglês, *early*)
- Embase - Excerpta Medical Database
- FP - Falso Positivo
- FN - Falso Negativo
- HC2 – Captura Híbrida (do inglês, *Hybride Capture*)
- HFKs - Queratinócitos Humanos Primários (do inglês, *Primary Human Keratinocytes*)
- HIS - Hibridização *In Situ* (do inglês, *In Situ Hybridization*)
- HIV - Vírus Da Imunodeficiência Humana
- HPV - Papilomavírus Humano
- HPV-HR - Papilomavírus Humano De Alto Risco
- HSIL - Lesões Intraepiteliais Escamosas De Alto Grau (do inglês, *High Grade Intraepithelial Lesions*)
- IBECS - Índice Bibliográfico Espanhol em Ciências da Saúde
- IC - Intervalo de Confiança
- INCA - Instituto Nacional de Câncer
- ISTs - Infecções Sexualmente Transmissíveis
- JEC - Junção Escamo Colunar
- L- Região Tardia (do inglês, *late*)
- LASER - Amplificação De Luz Por Meio De Emissão Estimulada De Radiação (do inglês, *Light amplification by stimulated emission of radiation*)
- LBC - Citologia Em Meio Líquido (do inglês, *Liquid Based Cytology*)
- LCR - Região Reguladora Não Codificada (do inglês, *Long Coding Region*)
- LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
- LLETZ - Procedimento De Excisão Eletrocirúrgica Com Alça (do inglês, *Large Loop Excision Da Transformation Zone*)
- LIE - Lesão Intraepitelial Escamosa
- LSIL - Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau (do inglês, *Low Grade Intraepithelial Lesions*)
- Medline - Medical Literature Analysis and Retrieval System Online

NASBA - Amplificação Baseada Na Sequência De Ácidos Nucleicos (Do Inglês, *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*)
NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical
OMS - Organização Mundial da Saúde
ORF – Fase De Leitura Aberta (do Inglês, *Open Reading Frames*)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
QUADAS-2 – Avaliação da Qualidade Metodológica dos Estudos (do inglês, *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy 2*)
RevMan - Review Manager versão 5.2
RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)
RNAm - Ácido Ribonucleico Mensageiro (do inglês, *Messenger RNA*)
SROC – Característica de Operação do Receptor (do inglês, *Summary Receiver Operating Characteristic*)
SUS - Sistema Único de Saúde
VP - Verdadeiro Positivo
VN – Verdadeiro Negativo
VVN - Valor Preditivo Negativo
VVP - Valor Preditivo Positivo
 χ^2 – Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 O VÍRUS PAPILOMA VÍRUS HUMANO – HPV	24
1.2 CÂNCER DE COLO UTERINO	27
1.3 DIAGNÓSTICO.....	30
1.3.1 Diagnóstico morfológico do HPV	30
1.3.1.1 Citologia oncótica	31
1.3.1.2 Colposcopia.....	31
1.3.1.3 Histopatológico	32
1.3.2 Diagnóstico molecular do HPV	32
1.3.2.1 Teste de amplificação de Sinal: Captura Híbrida	33
1.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
1.3.2.3 PCR em tempo real	34
1.3.2.4 Hibridização in situ (HIS).....	34
1.3.2.5 Microarrays	34
1.3.2.6 Detecção de RNA mensageiro viral para oncoproteína E6 e E735	
1.4 TRATAMENTO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU	35
1.5 RECORRÊNCIA DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO APÓS TRATAMENTO.....	36
1.6 JUSTIFICATIVA.....	38
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MÉTODOS	40
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	40
3.2 LOCAL DO ESTUDO	40
3.3 Critérios para seleção dos estudos.....	40
3.3.1 Critérios para inclusão dos estudos e participantes	40
3.3.2 Critérios para exclusão dos estudos e participantes	40
3.3.3 Desfechos mensurados	40
3.4 MÉTODOS DE BUSCA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ESTUDOS	41
3.4.1. Estratégia de busca no Medline (Pubmed)	46
3.5 SELEÇÕES DOS ESTUDOS	42
3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS	42
3.8 SÍNTESE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	45

4.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	45
4.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS	46
4.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE.....	48
4.4 DESEMPENHO DO TESTE DIAGNÓSTICO	50
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, na tentativa de combater o câncer, novos métodos de diagnóstico e terapias foram implementados. Entre os fatores etiológicos associados ao câncer, identificou-se que 23% dos casos de câncer estão associados a agentes infecciosos e o Papilomavírus Humano (HPV) é responsável por aproximadamente 30% de todos os novos casos de câncer no mundo¹.

O câncer de colo uterino está associado à infecção persistente pelo HPV oncogênico, especialmente o do tipo 16 e 18 e a expressão das oncoproteínas E6 e E7. Observa-se que o risco da associação entre HPV e câncer cervical em alguns estudos é maior do que 100, sendo que nenhum outro fator de risco para neoplasia cervical tem magnitude comparável².

No entanto, a presença do HPV é um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento do câncer de colo uterino. Na maioria das vezes a infecção cervical pelo HPV regride espontaneamente (em média entre seis meses a dois anos) e nos casos nos quais a infecção persiste pode ocorrer o desenvolvimento de lesões precursoras cujas identificação e tratamento adequado possibilitam a prevenção da progressão para o câncer cervical invasivo³.

O diagnóstico morfológico da infecção pelo HPV, por meio de citologia oncológica, é a estratégia de detecção das lesões precursoras e neoplásicas cervicais mais utilizada. Por ser a citologia um método de baixa sensibilidade, tem-se proposto testes moleculares para detectar o DNA ou o RNAm do HPV como novas estratégias de triagem e uma alternativa na prevenção do câncer de colo uterino^{4,5,6,7}.

1.1 O VÍRUS PAPILOMA VÍRUS HUMANO – HPV

O HPV é um vírus pequeno, não envelopado, de formato icosaédrico com partículas de diâmetro de 52 a 55nm, pertencente à família Papillomaviridae. O seu genoma está dividido em regiões denominadas *Open Reading Frames* (ORF), as quais se localizam em uma única molécula de DNA circular de dupla hélice, com aproximadamente 8 mil pares de bases, contida numa proteína esférica, o capsídeo (composto por 72 capsômeros). Os três fragmentos subgenômicos na organização do genoma do HPV são: região reguladora não codificada (LCR) e duas regiões codificadoras. As regiões codificadoras compreendem a região precoce (E – “*early*” com seis genes

(E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e a região tardia (L-“late”), que codifica dois genes (L1 e L2)^{8,9,10,11,12,13} (**Figura 1**).

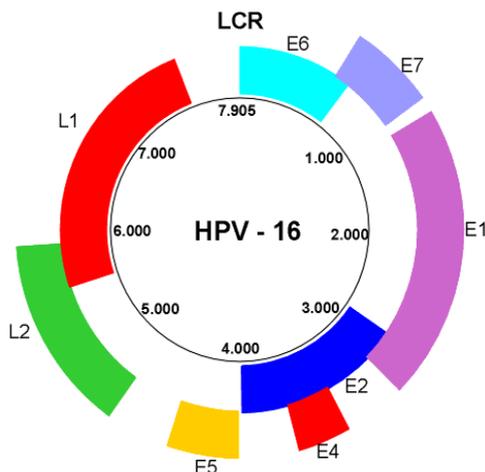


Figura 1 – Representação esquemática do genoma do HPV 16
Fonte: Adaptado de ARALDI et al., 2017¹

Nos humanos os tipos de HPV podem ser divididos clinicamente em 3 grupos, sendo o gênero alfa-papilomavírus considerado clinicamente o mais importante por estar associado ao câncer cervical e suas lesões precursoras. Dos mais de 200 tipos diferentes de HPV identificados, aproximadamente 40 são capazes de infectar o trato genital. A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer classificou 12 tipos de HPV como oncogênicos por estarem associados ao câncer de colo uterino: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59¹⁴. A classificação dentro de uma mesma espécie de HPV é baseada na homologia de seu genoma. A variação do potencial oncogênico está relacionada em parte pela expressão dos genes E6 e E7¹⁵.

O HPV infecta a camada basal do epitélio escamoso do colo do útero em decorrência da abrasão e micro lesões da pele ou mucosa. Após a entrada nos queratinócitos, o genoma de HPV se estabelece como epissomo em aproximadamente 50 cópias por célula, mantendo seu genoma com um baixo número de cópias. Nesta fase, há um baixo nível de expressão dos genes E1, E2, E6 e E7, suficiente para a manutenção genômica do vírus, que se replicam em sincronia com a replicação de DNA celular^{9,16,17}.

Nos casos de progressão da infecção para lesões pré-malignas e malignas (que não faz parte da história natural do HPV) há integração ao DNA da célula hospedeira, ocorrendo a quebra da região onde encontram-se os genes E1 e E2, levando a perda de sua função. Com a perda da função da região E2 altos níveis de oncoproteínas E6 e E7 são alcançados impedindo a progressão do ciclo celular e a diferenciação celular normal é retardada^{18,19,20}.

Apenas os genes E6 e E7 dos HPV de alto risco são capazes de imortalizar os Queratinócitos Humanos Primários (HFKs) através da interação com os genes p53 e pRb, removendo o controle do ciclo celular, impedindo o reparo do DNA, surgindo assim genes mutantes os quais não sofrem apoptose e são perpetuados, levando à proliferação desordenada das células transformadas^{18,21}.

A E6 é um dos primeiros genes expressados durante a infecção por HPV e é incapaz de sozinho imortalizar HFKs, necessitando assim de agir em conjunto com o E7²². A oncoproteína E6 liga-se a uma ubiquitina-ligase celular, formando um complexo com a proteína E6-AP (*E6-associated protein ligase*), que somente assim é capaz de se ligar a proteína p53. O complexo E6/E6-AP leva p53 a degradação proteolítica através da via da ubiquitina, diminuindo os níveis de p53 nas células infectadas^{23,24}. A degradação do p53 pela oncoproteína E6 resulta em ignorar os sinais normais de parada do crescimento nos pontos de controle G₁ / S e G₂/M levando a numerosas alterações genéticas que contribuem para a transformação maligna^{16,24}.

Além de direcionar a p53 para a degradação, as E6 ativam de forma independente, a telomerase nas células epiteliais (enzima que expande a região telomérica dos cromossomos) perpetuando a divisão celular e imortalizando a célula²⁵.

Nas divisões celulares o DNA celular perde nucleotídeos em suas extremidades cromossômicas e com o intuito de não perder informações genéticas importantes a região terminal dos cromossomos é protegido por uma sequência de DNA não codificante, os telômeros. A região do telômero quando encurtada sinaliza a célula entrar em senescência^{25,26,27}.

Nas células infectadas pelo HPV, a oncoproteína E7 liga-se à pRb impedindo a formação do complexo E2F-pRB, levando a célula entrar na fase S na ausência de sinais mitóticos e sem passar pela checagem celular. Na tentativa de estimular a formação do complexo E2F-pRB é aumentada a produção de p16 acumulando-se dentro das células^{28,29,30,31}. O aumento da p16 não está relacionado ao processo proliferativo celular e sim a desregulação do ciclo e do processo de senescência, desse modo pode ser

Intraepiteliais Cervicais (NIC) ou Lesões Intraepiteliais Escamosas (LIE)⁴¹. As NIC não são um processo contínuo, mas sim um sistema de duas doenças descontínuas, criando o conceito de Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL - do inglês *Low Grade Intraepithelial Lesions*) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL - do inglês *High Grade Intraepithelial Lesions*).

O câncer cervical é uma doença de evolução lenta, que se estende por um período de 10 a 15 anos em indivíduos imunocompetentes⁴² incluindo a infecção pelo HPV, a persistência da infecção, a progressão para lesão precursora e finalmente o desenvolvimento do câncer invasor. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por HPV e as LSIL são frequentemente reversíveis, e geralmente ocorrem o *clearance* da infecção viral e a regressão das lesões precursoras (fenômeno conhecido por infecção transitória)⁴³ (**Figura 3**).

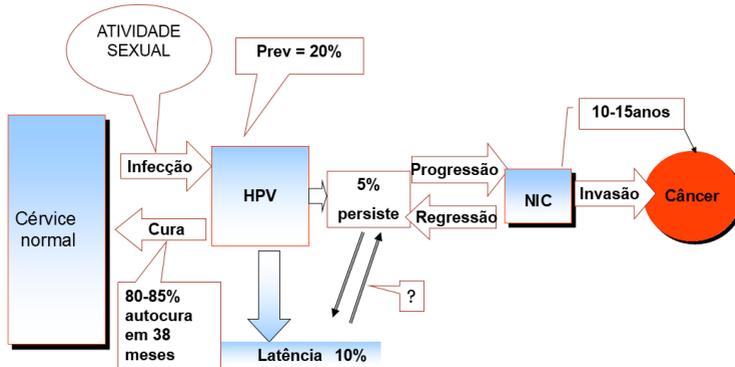


Figura 3 - História Natural da carcinogênese de colo uterino
Fonte: SCHIFFMAN; KJAER, 2003⁴¹

A graduação das lesões precursoras está embasada na intensidade dos distúrbios morfológicos celulares, relacionados, principalmente, com a proliferação, a atipia celular e a mitose. Esses critérios morfológicos são avaliados também em relação ao nível que alcançam na verticalidade do epitélio. Utiliza-se, universalmente, o sistema de divisão do epitélio em três terços: inferior, mediano e superficial. Deste modo, as LSIL, as alterações celulares e a perda de diferenciação ficam restritas ao terço inferior do epitélio (NIC I) e nas HSIL ocorrem nos 2/3 inferiores ou mais do epitélio (NICII e NICIII). No carcinoma *in situ* existe o envolvimento de toda a espessura do epitélio, sem qualquer evidência de diferenciação

celular, estando a membrana basal íntegra, e no carcinoma invasor a lesão progride além da membrana basal⁴⁴.

Mulheres com testes positivos para DNA de certos tipos de HPV têm quatro vezes mais chance de desenvolverem LSIL e treze vezes mais chances de HSIL. No decorrer de três anos, ao considerar os três últimos testes para HPV de alto risco positivos, o risco de desenvolverem câncer de colo uterino é quatorze vezes maior quando comparadas às mulheres que apresentam resultados negativos. Entretanto, alguns estudos longitudinais, 60% das LSIL regridem espontaneamente e raramente progridem ao câncer, enquanto nas HSIL o índice de eliminação diminui para 30% a 40% e cerca de 10% a 20% progridem a carcinoma invasor^{45,46} (**Figura 4**).

A persistência e a progressão das infecções por HPV variam de acordo com o genótipo do vírus, mesmo entre os de alto risco oncogênico⁴⁷. Mais de 70% dos cânceres de colo uterino no mundo são decorrentes do HPV 16 ou 18, sendo o HPV 16 responsável por 55% dos casos e o HPV 18 por 15% dos casos. Essa proporção é mantida em todos os continentes, inclusive na América do Sul, onde os HPV 16 e 18 são responsáveis por 65 a 70% dos casos de câncer de colo uterino⁴⁸.

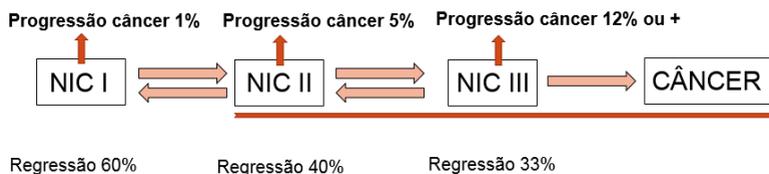


Figura 4 – Chances de regressão espontânea ou progressão para câncer das NIC
Fonte: Adaptado de OSTÖR, 1993¹¹⁷; PARASKEVAIDIS et al., 2001¹²³

Além de aspectos relacionados à própria infecção pelo HPV como: subtipo e carga viral, infecção única ou múltipla, outros fatores ligados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual parecem influenciar os mecanismos que determinam a regressão ou a persistência da infecção e também a progressão para lesões precursoras ou câncer de colo uterino⁴⁹. Desta forma, a multiparidade, o uso de contraceptivo oral, tabagismo, principalmente relatado em mulheres com HIV, história de infecções sexualmente transmissíveis (principalmente *Chlamydia* e Herpes genital) e deficiência nutricional, idade da coitarca, número de parceiros sexuais (durante toda a vida e recentes), histórico de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) estão ligados ao processo de aquisição do HPV e

não são considerados cofatores para a progressão da infecção pelo vírus^{42,49,50}.

1.3 DIAGNÓSTICO

A necessidade de se fazer a detecção e o tratamento precoce sem lesões precursoras do câncer de colo uterino causadas por HPV podem prevenir a progressão ao câncer¹⁷. O diagnóstico inicia-se com a avaliação clínica da paciente. A queixa mais frequente é o sangramento espontâneo ou o provocado pela atividade sexual. O diagnóstico é confirmado pela biópsia de qualquer lesão visível no colo, com ou sem o auxílio da colposcopia. A citologia oncótica (Papanicolau) é importante método de orientação, mas ele não detecta o vírus e sim as alterações que ele pode causar nas células^{51,52}.

O diagnóstico do HPV restringiu-se primeiramente a citopatologia e a histopatologia, até que foram desenvolvidos os métodos de biologia molecular capazes de detectar as sequências do DNA do HPV no material clínico⁵².

O diagnóstico de câncer ou de lesão precursora de colo uterino é realizado no Brasil, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), por 3 exames: citologia, colposcopia e histologia. No entanto a infecção por HPV pode também ser confirmada através de testes moleculares como: a hibridização molecular com sondas de ácidos nucleicos (*Southern blot*, dot blot, hibridização *in situ* (ISH), captura híbrida II (HC2), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), NASBA (*Nucleic Acid sequence Based Amplification*)) que detecta o RNAm viral das oncoproteínas E6 e E7^{53,54,55}. Nenhum método dos testes moleculares é ofertado pelo SUS.

1.3.1 Diagnóstico morfológico do HPV

As lesões oriundas de infecção pelo HPV provocam, geralmente, alterações morfológicas características, como a presença de coilócitos detectáveis em citologia de raspados cervicovaginais e biópsias⁵⁶. A Coloicitose é uma alteração que acomete células intermediárias ou superficiais e que se manifesta pela presença de citoplasma claro, vacualizado, que circula núcleo pequeno, irregular e hiper cromático. Outras alterações descritas são: presença de disqueratose, anomalias celulares compatíveis com a infecção pelo HPV definida em graus variados^{57,58,59,60}.

1.3.1.1 Citologia oncótica

Apesar da citologia oncótica apresentar número elevado de resultados falso-negativos (variando em torno de 15% a 50%) e de resultados falso-positivos (em média 10%) continua sendo uma alternativa muito adotada para a triagem do câncer de colo uterino⁴⁸ devido a sua simplicidade, fácil execução e baixo custo⁶¹.

A Citologia em Meio Líquido (LBC) é um método onde as células cervicais são imersas em um líquido conservante antes da fixação da lâmina⁶². Este método, comparado a citologia convencional, possui taxas mais reduzida de exames insatisfatórios e isto se deve ao fato de que com a LBC evita-se o possível ressecamento provocado pelo ar e reduzem elementos que dificultam o diagnóstico, como por exemplo a presença de sangue, muco e/ou células inflamatórias⁶³. Outras vantagens da LBC é de que além de representar o desenvolvimento técnico do preparo convencional, oferece um único meio de coleta de amostras que preservam os ácidos nucleicos, permitindo o transporte e armazenamento das amostras a temperatura ambiente e triagem em algoritmos que incluem o teste de HPV^{64,65}. O material residual pode ser utilizado para o diagnóstico, por meio de métodos biomoleculares, de infecções sexualmente transmissíveis como clamídia, gonocócicas e HPV⁶⁶.

A terminologia utilizada para descrever o resultado da citologia oncótica é realizada através da classificação do Sistema de Bethesda, submetida a várias revisões desde sua formulação sendo a última realizada em 2014⁶¹. No Brasil, a partir de 2001, com a atualização do Sistema de Bethesda, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e a Sociedade Brasileira de Citopatologia após o Seminário para Discussão da Nomenclatura Brasileira de Laudos de Exames Citopatológicos – CITO 2001 propõem uma nova nomenclatura para os laudos citopatológicos. Em 2002, durante o XVII Congresso Brasileiro de Citopatologia, a nova proposta que tem semelhanças com a Nomenclatura de Bethesda, foi oficializada e está em vigência até o presente momento, sendo a única no SUS e nos laboratórios conveniados na sua rede^{67,68}.

1.3.1.2 Colposcopia

A colposcopia é o método propedêutico de visualização direta do colo uterino com auxílio de um microscópio de campo estereoscópico, binocular, de baixa potência que amplia de 4 a 40 vezes o epitélio e com reações tinturiais¹⁴. A nomenclatura utilizada para descrição dos achados

colposcópicas foi primeiramente unificada em 1975 pela Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia e teve sua última alteração em 2002. A terminologia colposcópica recomendada ratificada pelo Comitê de Nomenclatura da Federação Internacional de Patologia Cervical e Colposcopia no Congresso de Barcelona de 2002^{57,69}.

A citologia oncótica não é capaz de delimitar a área cervical alterada. Para tanto nos casos de alterações do padrão normal do epitélio cervical, encaminha-se a mulher para avaliação colposcópica. Este exame tem sido utilizado como exame intermediário para investigação nos casos de citologia positiva, estabelecendo se a lesão é visível na ectocérvice e orientando o local para biópsia⁶⁹.

1.3.1.3 Histopatológico

Caso haja lesões encontradas durante a colposcopia, procede-se a biópsia incisional para diagnóstico histológico⁷⁰. O histopatológico é aceito como procedimento definitivo, considerado padrão-ouro, para o diagnóstico de lesões precursoras e neoplásicas cervical¹⁴. É através da histopatologia que, atualmente, baseiam-se as decisões terapêuticas⁵².

Estudos anatomopatológicos mostraram alterações semelhantes as encontradas na citologia, acrescidos de papilomatose, da hiperplasia da camada basal e da acantose, critérios arquiteturais inerentes ao estudo de preparados histopatológicos. Também de ser consideradas suspeita as células endocervicais com atipias nucleares⁵⁹.

A terminologia uniforme recomendada para descrever a histologia de doenças humanas associadas ao papilomavírus em todos os tecidos do trato anogenital: lesões intraepiteliais escamosas (LIE) de baixo grau (LSIL) ou de alto grau (HSIL). Podem ainda ser classificadas de modo mais específico em Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) I, II ou III⁷¹.

1.3.2 Diagnóstico molecular do HPV

Como consequência do conhecimento da relação causal entre infecção pelo HPV e neoplasia cervical os avanços nas metodologias para detecção destes surgiu a possibilidade de utilizar o HPV para detecção das lesões cervicais, assim identificando mulheres em risco de desenvolver neoplasia cervical⁷².

Os diagnósticos moleculares são métodos que se baseiam na detecção de DNA e RNA virais por técnicas de biologia molecular e apresentam elevada sensibilidade e moderada especificidade⁷³.

1.3.2.1 Teste de amplificação de Sinal: Captura Híbrida

A Captura Híbrida (HC) é uma técnica que fornece a tipagem viral por grupos e a estimativa da carga viral. Baseia-se em uma reação de hibridização molecular que utiliza sondas não radioativas de RNA, complementares a sequência genômica de 18 tipos de HPV, os que mais frequentemente infectam trato anogenital. O teste de CH pesquisa os tipos de HPV oncogênicos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 e os de baixo risco 6, 11, 42, 43 e 44⁷.

Na presença de partículas virais, formam-se os híbridos que são constituídos pelo DNA viral e as sondas específicas. Estes são capturados na parede do tubo de reação recoberta com anticorpos anti-híbridos RNA/DNA, marcados com fosfatase alcalina. Em seguida é feita a leitura do material com técnicas de quimioluminescência. Quanto maior o número de híbridos maior a luminosidade a qual é captada e quantificada por um luminômetro^{7,74}.

1.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Este método é uma reação enzimática que resulta na amplificação de material genético “*in vitro*”⁷⁵. Para a pesquisa do HPV, o DNA, material clínico a ser estudado, pode ser coletado por escova endocervical, lavado vaginal e por fragmento de biopsia a fresco ou bloqueado em parafina⁵⁹.

A reação faz-se a partir de uma primeira etapa de aquecimento em temperaturas elevadas, provocando a desnaturação do DNA, seguida de resfriamento, levando ao pareamento específico de dois segmentos pequenos de DNA (*primers*) ao gene de interesse, permitindo que uma enzima (DNA polimerase) sintetize novos fragmentos de DNA. Quantidades muito pequenas de DNA podem ser amplificadas de forma sensível e específica a partir de incubação na presença de reagentes até obter o produto final amplificado. A visualização do material amplificado é realizada por eletroforese em gel de agarose e a comparação com controles adequados e marcadores de tamanho permite sua identificação precisa⁷⁵.

Os *primers* MY09/1, PGMY09/11 e GP+5/+6 são os mais utilizados na maioria dos trabalhos que objetivam a detecção molecular do vírus e são capazes de detectar um grande número de tipos de HPV simultaneamente^{76,77,78}.

1.3.2.3 PCR em tempo real

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, detecta e quantifica o HPV e outros agentes infecciosos sem a necessidade da etapa pós amplificação como eletroforeses ou hibridizações. É uma técnica capaz de monitorar a amplificação do material genético enquanto a reação acontece⁷⁹.

A técnica se baseia na emissão de sinais fluorescentes constantes que ocorrem dentro dos poços de reação na medida que ocorre amplificação específica do DNA de HPV. Os resultados são expressos em forma de gráficos e a análise de positividade momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo ultrapassa um limite (*cuttoff/thereshold*) ou negatividade ocorrem em tempo real na tela do computador^{59,79}.

1.3.2.4 Hibridização in situ (HIS)

É uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de DNA ou RNA por meio de sondas marcadas com moléculas sinalizadoras não isotópicas e os sítios de ligação podem ser localizados por reações histoquímicas ou imuno-histoquímicas⁸⁰.

Quando em condições ideais a técnica de HIS traz a possibilidade de detectar o tipo viral, a localização das áreas infectadas e o estado físico do vírus (epissomal ou incorporado ao genoma da célula hospedeira⁵⁹.

1.3.2.5 Microarrays

Os ensaios de microarranjos de DNA (*microarrays*) são amplamente utilizados em pesquisa científica e também no diagnóstico e genotipagem do HPV⁸¹.

O teste PapilloCheck HPV Screening da empresa Greiner Bio-One, detecta 6 tipos de HPV de baixo risco (6,11,40,43, e 44) e 18 de alto risco (16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59 ,66, 68, 70, 73 e 82)^{79,82}. O teste que se baseia na amplificação por PCR de um fragmento de 350bp da região E1 do HPV e possui controles internos individuais que permitem avaliar a qualidade de todas as etapas do processo da amostra da qualidade do material do DNA⁸¹.

As amostras de células cervicais podem ser colhidas em Solução PresevCyt® (CytocCorp.), Fluido Conservante SurePath® (BD Diagnostics-TriPath) e Meio de Conservação da captura de Híbridos (Quiagen)⁵⁹.

1.3.2.6 Detecção de RNA mensageiro viral para oncoproteína E6 e E7

Trata-se de uma abordagem diagnóstica que detecta RNA mensageiros que codificam oncoproteína virais E6 e E7, as quais interferem nos sistemas de reparo do DNA (conforme já descrito anteriormente). O teste utiliza-se de técnica chamada *Real Time* onde utiliza a amplificação de forma isotérmica, a 41°C de maneira a evitar amplificação de DNA genômico viral⁵⁹.

As amostras de células cervicais podem ser colhidas em Solução PresevCyt® (CytocCorp) e Solução Conservação da Captura híbrida (Quiagen)⁵⁹.

A detecção da positividade é obtida por emissão luminosa que ocorre dentro dos poços de reação à medida em que acontece a transcrição *in vitro*, sendo os resultados expressos na forma de gráficos, podendo ser visualizados em tempo real pelo operador⁷⁹.

1.4 TRATAMENTO DA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL DE ALTO GRAU

Existem variedades de procedimentos que visam tratar as lesões de alto grau e a escolha do tratamento depende de critérios como idade, paridade, desejo reprodutivo, risco de perda de seguimento, a gravidade, a extensão e localização das lesões, concomitância com outras doenças ou gestação⁸⁴. Existe um consenso mundial que deve existir material histológico para análise e exclusão de foco de câncer microinvasor ou invasor. As diretrizes brasileiras reforçam que mulheres com NIC II ou III devem ser submetidas a procedimento excisional, exceto em gestantes e alguns casos específicos em adolescentes⁶⁷.

Os métodos utilizados para tratamento podem ser divididos em ablativos e excisionais. Os métodos ablativos (que destroem tecido afetado) incluem a crioterapia, ablação a *Light amplification by stimulated emission of radiation* (LASER), a eletrofulguração e a cauterização química⁸⁵. Os métodos ablativos não geram avaliações do ponto de vista anatomopatológica, sendo assim impossibilitando o diagnóstico em casos de carcinoma microinvasor⁸⁶.

Os métodos excisionais (que removem o tecido afetado) são a exérese da zona de transformação e a conização⁸⁶. A exérese da zona de transformação pode ser realizada nas situações em que a lesão está restrita ao colo do útero, nos casos de colposcopia satisfatória com Junção Escamocolumnar (JEC) no máximo até o primeiro centímetro do canal endocervical e nos casos de ausência de suspeita de invasão ou doença

glandular⁸⁷. Quando objetiva-se abordar a doença no canal endocervical, o método e excisional de preferência deve ser a conização em qualquer um dos métodos (realizada com bisturi a frio, laser ou eletrocirúrgica com bisturi de alta frequência e eletrodos)^{86,88}. A escolha do método excisional dependerá de vários fatores como aspecto anatômicos (colo plano), tamanho e localização da lesão, experiência do médico e recursos disponíveis⁸⁹.

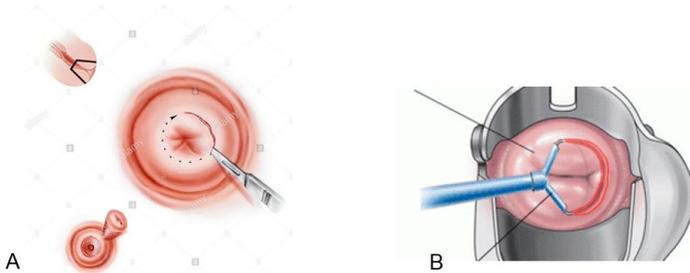


Figura 5 -Tratamento excisionais: A: Conização com bisturi a frio e B: Conização com bisturi de alta frequência
Fonte: LIMA et al., 2011⁸⁹

1.5 RECORRÊNCIA DAS LESÕES INTRAEPITELIAIS DO COLO UTERINO APÓS TRATAMENTO

A falha de tratamento ablativo ou excisional de NIC ocorre entre 1 a 25% dos casos. Para tratamento de uma NIC 2 ou 3 recorrentes o método excisional ou a histerectomia é aceitável. A maioria das recorrências se manifestará dentro dos dois primeiros anos após o tratamento e com aumento do risco de desenvolvimento de neoplasia invasora⁹⁰.

A recorrência das lesões de colo uterino ocorre por uma persistência da lesão após o tratamento, pela manutenção da infecção de HPV oncogênico ou por uma reinfecção. Como o momento da identificação da recorrência da lesão intraepitelial depende da sensibilidade dos exames de seguimento e na rotina este seguimento ocorre entre quatro a seis meses após o tratamento cirúrgico, a diferenciação entre persistência e recorrência da lesão intraepitelial é de difícil conceito⁹¹.

A recorrência de lesões precursoras após o tratamento varia muito na literatura, com frequência de 5,3% a 53%. Esta variação se deve muito a falta de padronização nos critérios utilizados para a definição de

recorrência (citopatológicos ou histopatológicos). O que se tem utilizado com maior frequência como fator de risco para recorrência é o envelhecimento (a idade a cima de 50 anos de idade), a carga viral, grau da lesão com a presença de extensão glandulares o status das margens cirúrgicas da conização (margens de ressecção positivas)^{12,90,92,93,94,95,96}

1.6 JUSTIFICATIVA

O câncer de colo uterino é um problema na saúde pública e corresponde a terceira localização de incidência e a quarta de mortalidade por câncer em mulheres no Brasil; com cerca de 265 mil óbitos/ano no mundo.

Atualmente o método diagnóstico de câncer de colo uterino ou de suas lesões precursoras mais utilizado é por meio de citologia oncótica, porém este método não apresenta uma boa acurácia, principalmente tratando-se de uma técnica isolada e aplicada em seguimento de câncer de colo uterino pós tratamento excisional. Buscam-se hoje por métodos mais acurados de rastreo, assim como no seguimento. Muitos países desenvolvidos já utilizam o citopatológico associado ao PCR-DNA de HPV como método de rastreo, no entanto fazem-se necessários testes acurados que possam servir de rastreo de lesões precursoras após o tratamento como o teste RNAm.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a acurácia do teste de RNAm HPV como preditor para a recorrência de lesões intraepiteliais de alto grau cervical ou câncer em pacientes submetidas a tratamento excisional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a acurácia do teste de RNAm HPV como preditor para a recorrência de lesões intraepiteliais de alto grau cervical ou câncer em pacientes submetidas a tratamento excisional, dividindo por técnica de diagnóstico que utiliza RNAm HPV;

- Comparar a acurácia do teste de RNAm HPV de alto risco com a da citologia, DNA HPV de alto risco e margens comprometidas, como preditor para a recorrência de lesões intraepiteliais de alto grau cervical ou câncer em pacientes submetidas a tratamento excisional, dividindo por técnica de diagnóstico que utiliza RNAm HPV.

3 MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O estudo caracteriza-se por Revisão Sistemática segundo as diretrizes de revisão sistemática e metanálise PRISMA^{97,98}.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade do Extremo Sul Catarinense no Laboratório de Biomedicina Translacional associada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e Saúde Coletiva.

3.3 CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DOS ESTUDOS

3.3.1 Critérios para inclusão dos estudos e participantes

Foram incluídos nesta Revisão Sistemática estudos de coortes prospectivas e retrospectivas nos quais foram realizados testes de detecção de RNA mensageiro viral para oncoproteínas E6 e E7 com ou sem citologia oncológica e biomarcadores DNA HPV de alto risco, coletados na linha de base (momento da conização) e no seguimento semestral. O histopatológico do colo uterino e teste referência devem ter sido realizados na peça da conização e durante o seguimento, na presença de lesão suspeita a colposcopia. Todos os estudos tiveram seguimento por período mínimo de 6 meses. Nenhuma restrição de idioma foi imposta na seleção de estudos.

3.3.2 Critérios para exclusão dos estudos e participantes

Foram excluídos os estudos em que a testagem de RNAm foi realizada a partir de mulheres diagnosticadas com câncer cervical ou em tecido e não a partir do esfregaço cervical.

3.3.3 Desfechos mensurados

O desfecho foi recorrência ou não das lesões precursoras do câncer de colo uterino após conização. Os desfechos foram NIC2+ (NIC 2, NIC3 ou câncer) e NIC3+ (NIC3 ou câncer).

3.4 MÉTODOS DE BUSCA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ESTUDOS

Antes de iniciar a pesquisa, foi realizado o registro do projeto da revisão sistemática no PROSPERO (International prospective register of systematic reviews, www.crd.york.ac.uk/prospero). Após aprovado, o projeto recebeu o código CRD42017074404 e posteriormente, foi iniciada uma busca exaustiva das bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (Medline) via Pubmed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), *Cancer Literature (Cancerlit)*, SciVerse Scopus (Scopus), Índice Bibliográfico Espanhol em Ciências da Saúde (IBECS) e *Excerpta Medical Database* (Embase), *Cochrane Library*, Web of Science e Literatura Cinza (que inclui o Google Acadêmico, trabalhos publicados em congressos, relatórios técnicos governamentais, e outros materiais não controlados por editoras científicas) por publicações relevantes de 1990 a janeiro 2018. Os bancos de dados foram pesquisados utilizando os seguintes termos: “Cancer of Cervix”, “HSIL”, “HPV-mRNA test” e “Conization”. A pesquisa foi limitada em humanos, mas não houve restrição de idioma. As listas de referências de todos os estudos de diagnóstico primário recuperados foram verificadas.

3.4.1. Estratégia de busca no Medline (Pubmed)

1. “Cancer of Cervix”
2. “Cancer of the Cervix”
3. “Cervical Cancer”
4. “Cervical Neoplasms”
5. “Cervix Cancer”
6. “Uterine Cervical Cancer”
7. “Uterine Cervical Neoplasm”
8. “HSIL”
9. “High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions”
10. “LSIL”
11. “ASCUS”
12. “atypical squamous cells of undetermined significance”
13. “ASC-H”
14. “Atypical Squamous Cells Cannot Exclude HSIL”
15. “Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions”
16. “Cervical Intraepithelial Neoplasia”

17. “Cervical Intraepithelial Neoplasms”
18. “cin”
19. “CIN1”
20. “CIN2”
21. “CIN3”
22. “CKC”
23. “Conization of the cervix”
24. “Cold knife cone”
25. “LEEP”
26. “Loop Electrosurgical Excision Procedure”
27. #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6 OR #7 OR #8 OR #9
OR #10 OR #11 OR #12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16 OR #17 OR
#18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26
28. “HPV-mRNA test”
29. “mRNA”
30. “Messenger RNA”
31. #28 OR #29 OR #30
32. #27 AND #31

3.5 SELEÇÕES DOS ESTUDOS

Dois revisores, Ana Cristina L. Macedo (ACLM) e Cristini da Luz Moretti Borba (CLMB) analisaram de forma independente os títulos e os resumos dos estudos adquiridos pelas estratégias de busca, com o auxílio do *Covidence* (www.covidence.org). Os artigos potenciais para inclusão foram separados para leitura na íntegra.

As discordâncias foram resolvidas por um terceiro revisor, Maria Inês Rosa (MIR), tanto para artigos em inglês como em outro idioma.

3.6 EXTRAÇÃO DE DADOS

A extração de dados foi realizada mediante formulário de coleta relacionando, no objetivo principal, a positividade ou não do teste de RNAm HPV no seguimento e a presença ou não de lesão precursora ou câncer no mesmo momento.

3.7 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS

Todos os artigos adquiridos pelo critério de elegibilidade, foram avaliados quanto as suas qualidades metodológicas através do QUADAS-2 (*Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies 2*)⁹⁹. Essa

avaliação envolve analisar o desenho clínico do estudo e dados relevantes sobre a seleção da população em estudo, teste diagnóstico, teste de referência e fluxo entre a coleta do teste em avaliação e referência. Cada domínio é avaliado em termos de risco de viés e os três primeiros também são avaliados em termos de preocupações em relação à aplicabilidade do estudo^{99,100}. Para ajudar no julgamento do risco de viés, questões de sinalização estão incluídas e são respondidas com “sim” “não” e “não claro” e são formuladas de modo que o “sim” represente baixo risco de viés. Os itens foram classificados como positivos (baixo risco de viés), negativos (potencial risco de viés), ou informação insuficiente quando “não claro” foi utilizado por haver poucos critérios para julgamento e são considerados incertos.

Os quesitos avaliados foram os seguintes:

Seleção de Pacientes:

1. Foi uma amostra consecutiva ou aleatória de pacientes inscritos?
2. O design de caso controle foi evitado?
3. O estudo evitou exclusões inapropriadas?
4. A seleção de pacientes poderia ter introduzido viés?
5. Preocupações em relação à aplicabilidade: Há preocupações de que os pacientes incluídos e a configuração não correspondam à pergunta de revisão?

Teste Estudado:

1. Os resultados do padrão de referência foram interpretados sem o conhecimento dos resultados do padrão ouro/referência?
2. Se um limite foi usado, ele foi pré-especificado?
3. A conduta ou interpretação do teste de índice poderia ter introduzido viés?

Preocupações em relação à aplicabilidade: Existem preocupações de que o teste do índice, sua conduta ou interpretação difiram da pergunta de revisão?

Padrão-Ouro

1. Os padrões de referência são capazes de classificar corretamente a condição-alvo?
2. Os resultados padrão de referência foram interpretados sem o conhecimento dos resultados do padrão ouro/referência?
3. O padrão de referência, sua conduta ou sua interpretação poderiam ter introduzido viés?

Preocupações em relação à aplicabilidade: Há preocupações de que a condição de destino, conforme definido pelo padrão de referência, não coincidam com a pergunta crítica?

Fluxo e Tempo

1. Houve um intervalo apropriado entre o teste estudado e o padrão de referência?
2. Todos os pacientes atendem ao padrão de referência?
3. Todos os pacientes foram incluídos na análise?
4. O fluxo do paciente poderia ter introduzido viés?

3.8 SÍNTESE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Esta revisão sistemática de acurácia diagnóstica apresenta os resultados da metanálise por meio das medidas: sensibilidade, especificidade, Diagnostic Odds Ratio (DOR) e AUC.

A sensibilidade representa o poder do teste em classificar como doentes aqueles que realmente são doentes, a especificidade representa o poder do teste em classificar como não doentes aqueles que realmente não são doentes^{101,102}. O Odds Ratio, que em estudos de acurácia diagnóstica é denominado Odds Ratio Diagnóstica (DOR), expressa a chance de ter um resultado positivo pelo teste em avaliação nos doentes se comparado com um teste negativo¹⁰². O valor de DOR quanto mais alto maior é o grau de relevância para o teste diagnóstico e resultados um (1) revela um teste sem poder discriminatório^{102,103}. Quando uma das células da tabela de contingência 2 x 2 apresentou valor zero, este foi substituído pelo 0,5 e acrescentado o mesmo valor nas outras, com intuito de viabilizar os cálculos. No entanto, naqueles em que o valor zero ocorreu em mais de duas células o estudo foi excluído da metanálise¹⁰³.

Para identificar a heterogeneidade nos estudos causada por diferenças estatística, clínicas ou metodológicas dos estudos primários foi utilizado o teste do qui quadrado (χ^2), Q de Cochran. A inconsistência encontrada entre os estudos foi avaliada por meio do cálculo do índice I^2 .

O teste do qui-quadrado é convencionado um nível de significância de $p < 0,05$. O teste Q de Cochran parte do pressuposto que os achados dos estudos primários são iguais (hipótese nula) e verifica se os dados encontrados refutam esta hipótese. Se a hipótese nula for confirmada, os estudos são considerados homogêneos ($p > 0,05$). Como já foi supramencionado, o valor p calculado indica se a heterogeneidade é significativamente, ou não, diferente de zero^{81, 104}.

A magnitude da heterogeneidade é averiguada principalmente pela estatística I^2 , proposta por Higgins e Thompson, que é obtida a partir da estatística Q do teste de Cochran e do número J de estudos envolvidos na metanálise. A estatística I^2 pode variar de valores negativos até 100%. Quando o valor for negativo ele é igualado a 0. O valor p de I^2 é

equivalente ao valor p de Q . Interpretativamente, uma escala com um valor I^2 próximo a 0% indica não heterogeneidade entre os estudos, próximo a 25% indica baixa heterogeneidade, próximo a 50% indica heterogeneidade moderada e próximo a 75% indica alta heterogeneidade substancial entre os estudos^{81, 105,106,107}.

A variabilidade entre o resultado de cada estudo foi primeiro avaliada pelo gráfico de floresta da sensibilidade e especificidade. Neste tipo de figura cada linha representa um estudo e sua medida de efeito (que pode ser representada pela figura geométrica) incluindo o intervalo de confiança, sendo o tamanho deste símbolo proporcional ao peso do estudo na metanálise (quanto maior o peso maior é o tamanho da medida de efeito). Ao lado do estudo também é exibida uma linha horizontal que representa seu intervalo de confiança (quanto maior a linha maior será a variabilidade dentro do estudo) e na última linha é ilustrado a combinação dos resultados, pela figura geométrica de um losango ou diamante, que inclui o efeito sumarizado e a largura representa o intervalo de confiança^{99, 108}.

Para produzir uma estimativa combinada da sensibilidade e especificidade, juntamente com Intervalos de Confiança (IC) de 95%, foi gerada a curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve – SROC), utilizando o método DerSimonian e Laird (REM)¹⁰⁶. Além disso, a área sob a curva (AUC) pode resumir a capacidade intrínseca de um teste para discriminar um doente de um não doente. Um teste diagnóstico acurado deve posicionar os pontos associados a sensibilidade e especificidade de cada estudo no canto superior esquerdo do gráfico onde a sensibilidade e especificidade são próximas de 1^{102,103,105,106,109}.

A análise estatística foi realizada com o software Meta-DISC® (Unidade de Bioestatística Clínica, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Espanha) (versão 1.4).

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

A pesquisa identificou um total de 3735 estudos, que foram avaliados de acordo com título e resumo. No primeiro momento destes estudos 438 eram duplicados e foram identificados pelo *Covidence*, restando 3297 estudos a serem avaliados. Este grande número de títulos duplicados deve-se ao fato do programa reunir a busca de diferentes bancos de dados. Destes 3297, 187 eram potencialmente relevantes e foram lidos na íntegra. A partir desses 182 artigos foram excluídos, por

não cumprirem os critérios de exclusão: não ser possível realizar a tabela de contingência 2 x 2, não se tratar teste RNAm HPV de seguimento pós tratamento excisional para lesões de alto grau ou por ser estudos de revisão, restando cinco estudos incluídos na metáanálise (**Figura 6**).

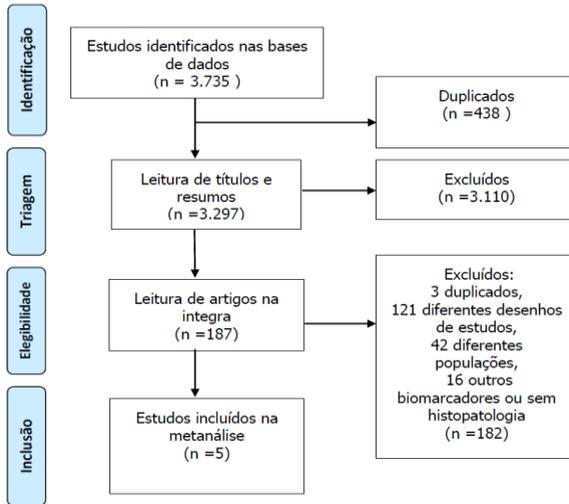


Figura 6 - Fluxograma da estratégia de busca e seleção dos estudos.

Fonte: Do Autor, 2018

Cinco estudos envolvendo 1.148 pacientes preencheram os critérios de inclusão: Frega et al, 2014¹¹⁰, Persson et al, 2012¹¹¹, Tropé et al, 2011¹¹², Zappacosta et al, 2013¹¹³ e Zhao e Shao, 2016¹¹⁴.

4.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

As características de todos os estudos incluídos estão resumidas na **Tabela 1**. Um mil e cento e quarenta e oito mulheres (1.148) dos cinco estudos observacionais inclusos na revisão sistemática foram acompanhadas por coortes desenvolvidas na Itália, Suécia, Noruega e China. Quinhentas e trinta e três (533) dessas mulheres foram estudadas na Itália por dois (2) grupos de estudos diferentes (Frega et al, 2014¹¹⁰ e Zappacosta et al, 2013¹¹³). Os demais estudos foram desenvolvidos: Suécia (Persson et al, 2012¹¹¹), Noruega (Tropé et al, 2011¹¹²) e China (Zhao e Shao, 2016¹¹⁴). A idade média das participantes foi encontrada em quatro (4) dos estudos sendo que em um dos estudos, Zhao e Shao, 2016¹¹⁴, descrevem como uma variável categórica ordinal sendo

distribuída a amostra em mulheres com menos de quarenta (40) anos ou mais. Frega et al, 2014¹¹⁰ e Tropé et al, 2011¹¹² utilizaram o mesmo teste RNAm HPV E6/7 durante o seguimento pós tratamento cirúrgico das lesões de alto grau e/ou câncer de colo do útero: PreTect HPV Proofer. Persson et al, 2012¹¹¹, utilizaram o teste RNAm HPV E6/7 APTIMA, Zappacosta et al, 2013¹¹³ o Nuclisens EasyQ HPV e Zhao e Shao, 2016¹¹⁴ o Quantivirus.

Comparando o RNAm de HPV à citologia e ao DNA de HPV- HR quatro estudos aplicaram dois ensaios à mesma amostra, possibilitando compará-los. Os testes de DNA aplicado por Frega et al, 2014¹¹⁰, Persson et al, 2012¹¹¹, Tropé et al, 2011¹¹² e Zhao e Shao, 2016¹¹⁴, foi o PCR e Zappacosta et al, 2013¹¹³, utilizam a HC2.

Todas as mulheres dos estudos foram acompanhadas após o tratamento cirúrgico por pelo menos 6 meses, sendo aplicado o teste RNAm HPV em seguimento: Frega et al, 2014¹¹⁰ aplicam o teste em 6, 12, 24 e 36 meses pós conização, Zhao e Shao¹¹⁴, 2016, em 3, 6 e 12 meses após conização, Zappacosta et al, 2013¹¹² com 6 meses e após 24 meses da conização e Tropé et al¹¹², 2011 aplica o teste uma única vez: após 6 meses da conização. Persson et al, 2012¹¹², não especifica o momento exato da aplicação do teste, relata que é realizado na primeira consulta pós conização e complementa relatando que o acompanhamento/seguimento das mulheres pós conização se dá em tempo médio de 1.333 dias ou 3,6 anos.

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática

AUTOR/ANO	PAÍS	IDADE MÉDIA	N TOTAL	N BENIGNO	N CIN2+	TESTE DNA HPV HR	TESTE RNAM HPV	INTERVALO DO SEGUIMENTO
Frega et al, 2014¹¹⁰	Itália	37,8 ± 9,7	475	376	99	PCR	PreTect HPV Proofer	6, 12, 24 e 36 meses
Persson et al, 2012¹¹¹	Suécia	31.3	117	110	7	PCR	APTIMA	1ª visita pós conização
Tropé et al, 2011¹¹²	Noruega	37.6	344	283	61	PCR	PreTect HPV Proofer	6 meses
Zappacosta et al, 2013¹¹³	Itália	37,5 ± 10	58	45	13	HC2	Nuclisens EasyQ HPV	6 meses
Zhao e Shao, 2016¹¹⁴	China	39%>40 61%<40	154	123	31	PCR	Quantivirus	3, 6 e 12 meses

Fonte: Do autor, 2018.

4.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS

O resultado da avaliação da qualidade metodológica dos estudos, realizada de acordo com o QUADAS-2^{99,100} encontra-se ilustrado na Figura 6. De modo geral, os estudos são considerados de alta qualidade, o risco de viés e as suas aplicabilidades possuem avaliações positivas, sendo que em dois (2) dos cinco (5) estudos, o de Tropé, 2011¹¹² e de Zhao e Shao¹¹⁴, 2016 tiveram todos os itens bem esclarecidos e descritos em seus estudos. Em relação ao teste estudado, 3 coorte, as dos autores Frega et al., 2014¹¹⁰, Persson et al.,¹¹¹ 2012 e Zapaccosta et al.,¹¹³, 2013, não mencionam cegamento dos patologistas em seus textos, deixando assim esta avaliação duvidosa. Todavia todos os estudos incluídos utilizaram o teste histopatológico como referência, e os testes do índice foram claramente citados, portanto, o fator não claro deixado pelos autores Frega, 2014¹¹⁰, Persson¹¹¹ 2012 e Zapaccosta¹¹³, 2013 foi pouco preocupante, reforçando assim o baixo risco de vieses dos estudos.

	<u>Risco de Viés</u>				<u>Aplicabilidade</u>		
	Seleção de Pacientes	Teste diagnóstico	Padrão Ouro	Tempo e fluxo	Seleção de Pacientes	Teste diagnóstico	Padrão Ouro
Frega et al. 2014	+	?	+	+	+	+	+
Persson et al. 2012	+	?	+	+	+	+	+
Tropé et al. 2011	+	+	+	+	+	+	+
Zappacosta et al. 2013	+	?	+	+	+	+	+
Zhao e Shao. 2016	+	+	+	+	+	+	+

● Alto Risco	? Incerto	+ Baixo Risco
---	---	--

Figura 7- Resultado da avaliação de cada estudo de acordo com o QUADAS-2
 Fonte: Do Autor, 2018.

4.4 DESEMPENHO DO TESTE DIAGNÓSTICO

O desempenho dos testes RNAm apresentaram uma sensibilidade combinada de 62,2% (IC95% 54,5 - 69,5), especificidade combinada de 91,9% (IC95% 90,0-93,5), DOR de 30,2 (IC 95% 9,3 – 98,7) e AUC 0,5978 visualizado nas figuras 8, 9, 10 e 11. Para esta análise foram utilizados os 5 estudos. Os testes DNA HPV-HR, mostrando o mesmo resultado, apresentaram uma sensibilidade agrupada de 86,8 (IC 95% 80,5–91,6), especificidade combinada de 72,4 (IC 95% 69,4 – 75,2), DOR de 33,9 (IC 95% 69,0 – 166,5) e AUC 0,6486 visualizados nas diguras 12, 13, 14 e 15. A citologia oncótica apresentaram uma sensibilidade agrupada de 71,1% (IC 95% 63,4 – 78,0), especificidade combinada de 87,2% (IC 95%: 84,9–89,3), DOR de 19,5 (IC 95% 9,0 - 42,1) e AUC 0,9292, ilustrada nas figuras 16, 17, 18 e 19. Na tabela 2 encontra-se contigênica agrupada do teste de RNAm HPV, a tabela 3 encontra-se contigênica agrupada do teste de DNA HPV-HR e a tabela 4 a contigênica agrupada da citologia oncótica. A tabela 5 compara todos o teste RNAm HPV para detecção de NIC em histopatológico, aplicado a mesma amostra, em comparação com teste de DNA e citologia (utilizando 4 estudos, pois Zappacosta¹¹³ não separou os resultados da citologia ao DNA HPV HR). Todos os testes utilizaram o Meta-DISC ® .

Tabela 2 - Tabela de contingência agrupada do teste RNAm HPV.

Estudo/Ano	Verdadeiros Positivos	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Verdadeiros Negativos
Frega et al, 2014	59	54	40	322
Persson et al, 2012	4	7	3	103
Tropé et al, 2011	10	16	12	306
Zappacosta et al, 2013	10	0	3	45
Zhao e Shao, 2016	24	2	7	121

Fonte: Do Autor, 2018

O gráfico da sensibilidade apresentado na Figura 8 ilustra a sensibilidade que foi de 62,4% (IC95%: 54,5 - 69,5) e a inconsistência apresentada ($I^2=46,4\%$) foi moderada.

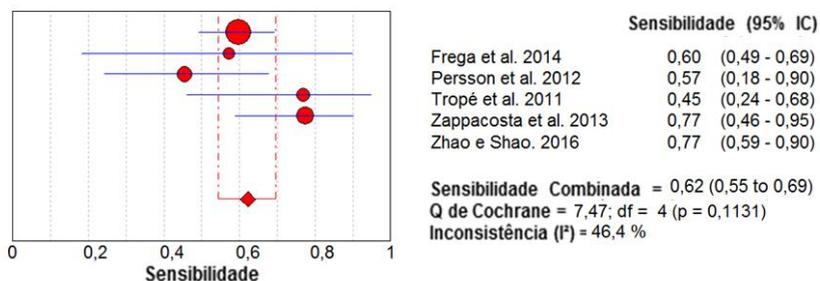


Figura 8- Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste RNAm HPV.
Fonte: Do Autor, 2018

O gráfico de floresta apresentado na Figura 9 corresponde a especificidade que foi de 91,9% (IC 95%: 90,0 - 93,5) e a inconsistência apresentada ($I^2=89,8\%$) foi alta.

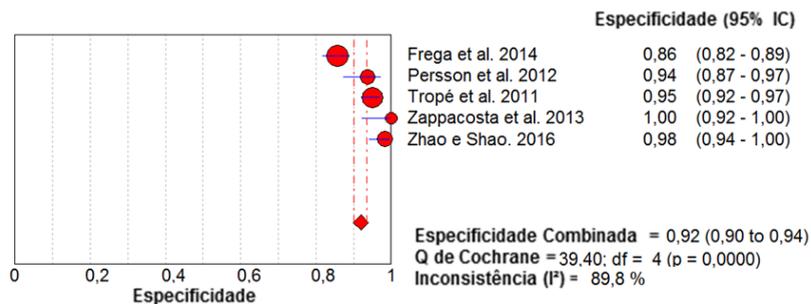


Figura 9 - Gráfico Floresta da Especificidade dos estudos do teste RNAm HPV.
Fonte: Do Autor, 2018

A DOR global, ilustrada na Figura 10, foi de 30,2 (IC 95%: 9,27 – 98, 66), portanto, a chance de um resultado positivo diagnosticado pelo teste RNAm HPV entre sujeitos com NIC2+ foi 30,2 vezes maior do que a chance de um resultado positivo em indivíduos sem estes desfechos.

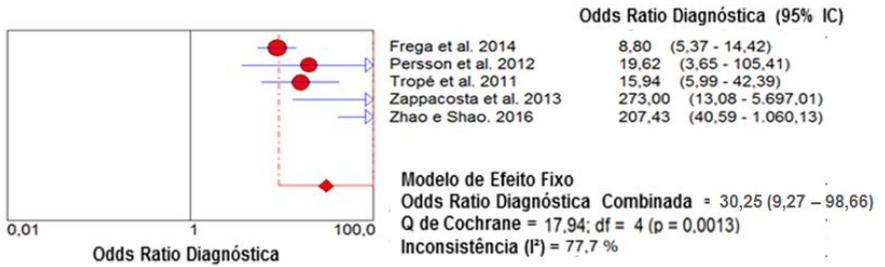


Figura 10 - Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste RNAm HPV
 Fonte: Do Autor, 2018

Na análise do teste RNAm HPV, a área sob a curva SROC ilustrada na Figura 11 foi baixa⁹⁵, ($AUC = 0,5978$), e o ponto Q^* foi de $0,5737$ considerando o teste RNAm HPV.

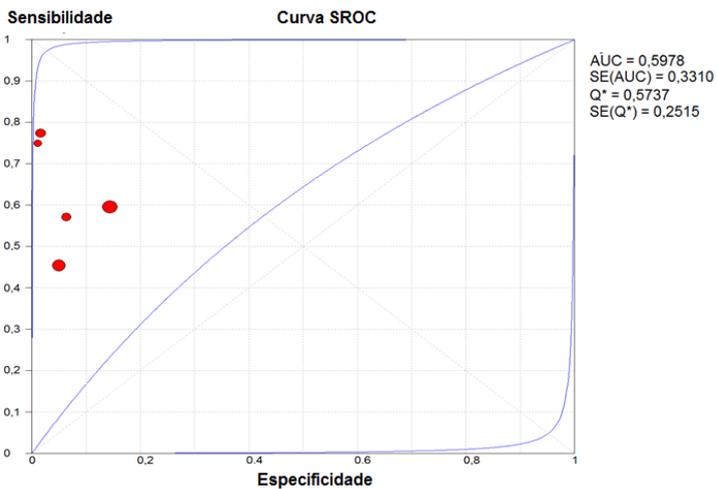


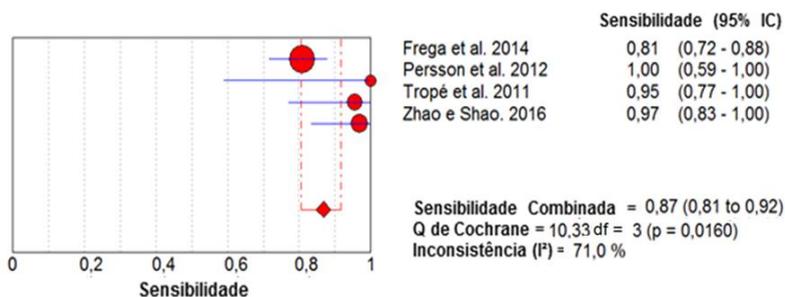
Figura 11 - Curva SROC do teste RNAm HPV nos estudos.
 Fonte: Do Autor, 2018.

Tabela 3 - Tabela de contingência agrupada do teste DNA HPV nos estudos.

Estudo/Ano	Verdadeiros Positivos	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Verdadeiramente Negativos
Frega et al, 2014	80	124	19	252
Persson et al, 2012	7	21	0	89
Tropé et al, 2011	21	85	1	237
Zhao e Shao, 2016	30	27	1	96

Fonte: Do Autor, 2018

O gráfico da sensibilidade para o teste de DNA HPV HR apresentado na Figura 12 ilustra a sensibilidade que foi de 86,8% (IC95%: 80,5% - 91,6%) e a inconsistência apresentada ($I^2 = 71,0\%$) foi moderada.

**Figura 12** - Gráfico Floresta da Sensibilidade dos estudos do teste DNA HPV HR.

Fonte: Do Autor, 2018.

O gráfico de floresta apresentado na Figura 13 corresponde a especificidade do teste de DNA HPVHR que foi de 72,4% (IC 95%: 69,4% - 75,2%) e a inconsistência apresentada ($I^2=7470\%$) foi moderada.

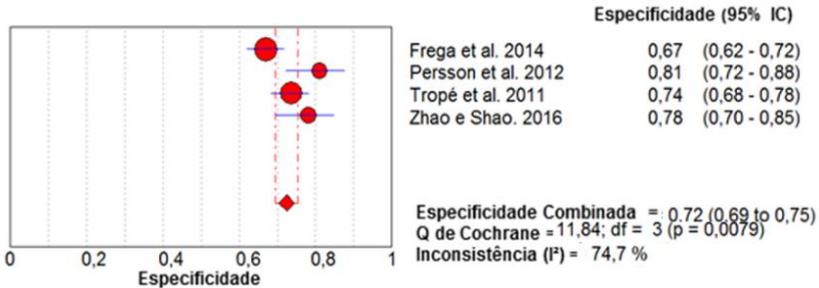


Figura 13 - Gráfico floresta da especificidade dos estudos do teste DNA HPV HR.

Fonte: Do Autor, 2018.

A DOR global do teste de DNA HPV HR, ilustrada na Figura 14, foi de 33,9 (IC 95%: 69,0% - 166,5%), portanto, a chance de um resultado positivo diagnosticado pelo teste DNA HPV entre sujeitos com NIC2+ foi 33,9 vezes maior do que a chance de um resultado positivo em indivíduos sem estes desfechos.

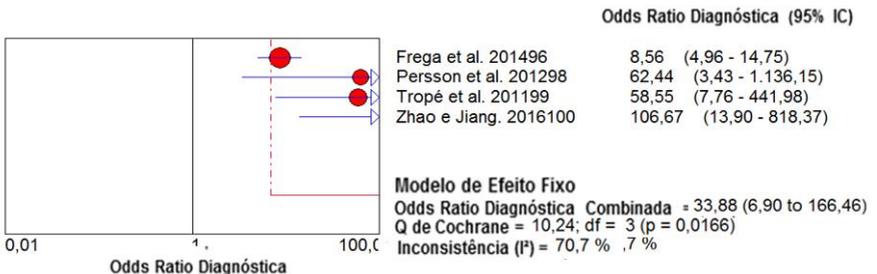


Figura 14 - Gráfico floresta da DOR dos estudos do teste DNA HPV HR.

Fonte: Do Autor, 2018.

Na análise do teste DNA HPV HR, a área sob a curva SROC ilustrada na Figura 15 foi baixa, (AUC = 0,6486), e o ponto Q* foi de 0,0690.

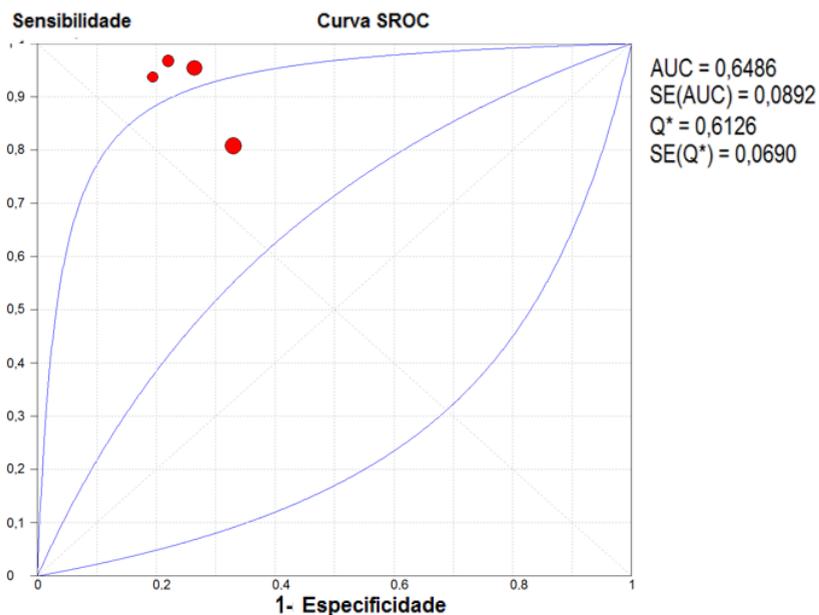


Figura 15 - Curva SROC dos estudos do teste DNA HPV HR.
Fonte: Do Autor, 2018.

Tabela 4 - Tabela de contingência agrupada citologia oncótica nos estudos.

Estudo/Ano	Verdadeiros Positivos	Falsos Positivos	Falsos Negativos	Verdadeiros Negativos
Frega et al, 2014	66	59	33	317
Persson et al, 2012	6	14	1	96
Tropé et al, 2011	14	32	8	290
Zhao e Shao, 2016	27	14	4	109

Fonte: Do Autor, 2018.

O gráfico da sensibilidade para a citologia oncótica apresentado na Figura 16 ilustra a sensibilidade que foi de 71,1% (IC95%: 63,4% - 78,0%) e a inconsistência apresentada ($I^2 = 56,1\%$) foi moderada.

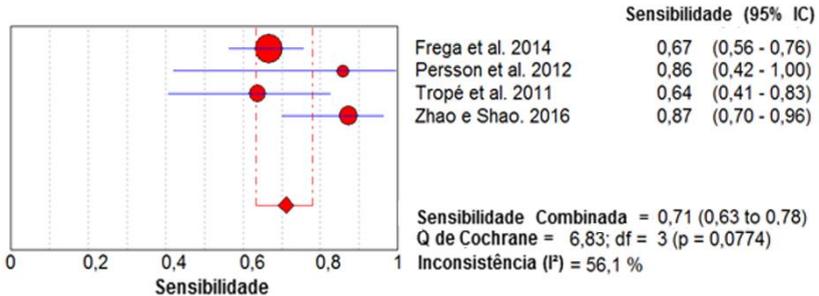


Figura 16 - Gráfico floresta da sensibilidade dos estudos da citologia oncótica.
Fonte: Do Autor, 2018.

O gráfico de floresta apresentado na Figura 17 corresponde a especificidade citologia oncótica que foi de 87, 2% (IC 95%: 84,9% - 89,3%) e a inconsistência apresentada ($I^2=44,6\%$) foi moderada.

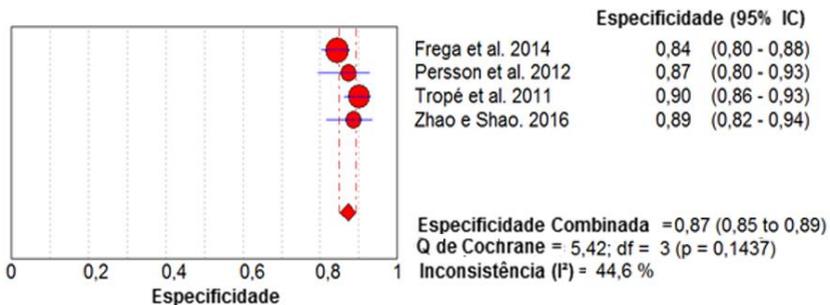


Figura 17 - Gráfico floresta da especificidade dos estudos da citologia oncótica.
Fonte: Do Autor, 2018.

A DOR global da citologia oncótica, ilustrada na Figura 18, foi de 19,5 (IC 95%: 9,0 - 42,1), portanto, a chance de um resultado positivo

diagnosticado pela citologia oncótica entre sujeitos com NIC2+ foi 19,5 vezes maior do que a chance de um resultado positivo em indivíduos sem estes desfechos.

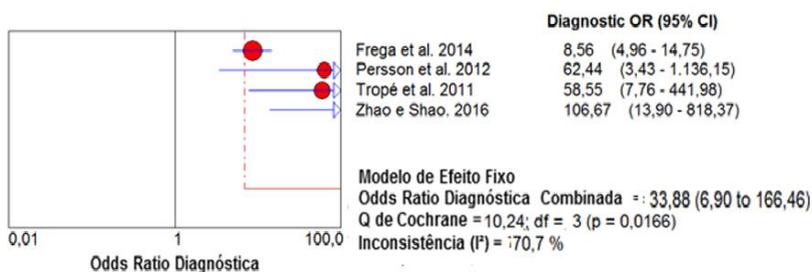


Figura 18 – Gráfico de floresta da DOR dos estudos da citologia oncótica.
Fonte: Do Autor, 2018.

Na análise da citologia oncótica, ilustrada na Figura 19, a área sob a curva SROC foi baixa, (AUC = 0,9292), e o ponto Q* foi de 0,0400.

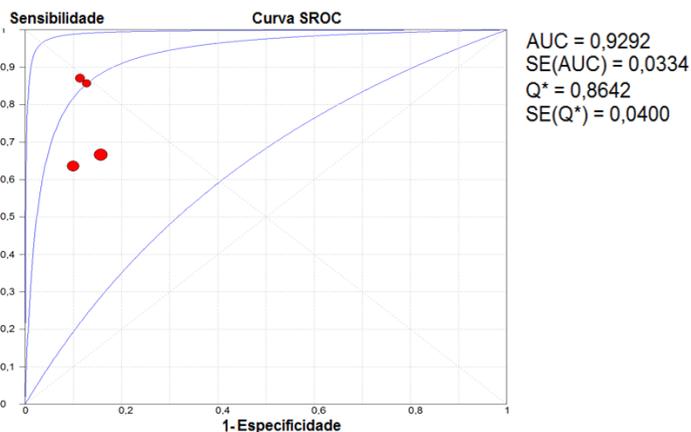


Figura 19 - Curva SROC da citologia dos estudos da citologia oncótica.
Fonte: Do Autor, 2018

Tabela 5- Acurácia do teste RNAm HPV para detecção de NIC em histopatológico, comparada com teste de DNA e citologia.

	Cinco Estudos		Quatro Estudos	
	RNAm HPV % (95%CI)	RNAm HPV % (95%CI)	DNA HPVHR % (95%CI)	Citologia % (95%CI)
Sensibilidade	62.4 (54.8-69.7)	61.3 (53.2-68.8)	86.8 (80.5-91.6)	71.1 (63.4-78.0)
Especificidade	91.9 (90.0-93.5)	91.5 (89.5-93.2)	72.4 (69.4-75.2)	87.2 (84,9- 89,3)
DOR	30.2 (9.50-100.52)	23.7 (7.45-75.67)	33.9 (6.89-166.46)	19.5 (9.0-42.1)
AUC	0.5685	0.6343	0.6486	0.9292
VP	107	97	138	113
FP	79	79	257	119
FN	65	62	21	46
VN	897	852	674	812
N total	1,148	1,090	1,090	1,090

Fonte: Do autor, 2018

5 DISCUSSÃO

A Neoplasia Intraepitelial Cervical é um precursor de carcinoma invasivo do colo do útero tendo o HPV em 99,7% dos cânceres cervicais, como descrito anteriormente^{2,3,41,49,115,116}. O objetivo desta revisão sistemática foi avaliar a acurácia do biomarcador RNAm HPV como um meio de identificar NIC e câncer do colo uterino, uma doença com alta prevalência, principalmente em países de baixa renda, no seguimento pós-conização.

A infecção pelo HPV é transitória e apenas 10% das infecções são persistentes e podem desenvolver-se a uma lesão maligna, através da expressão das oncoproteínas E6 / E7^{18, 19,20}. A conização representa uma técnica de diagnóstico e terapêutico necessária para o tratamento de mulheres afetadas por lesões de alto grau ou câncer microinvasivo^{68, 84,86,88,89}. Se deixada sem tratamento, mais de 30% das lesões NIC2 + são estimados para progredir para carcinoma cervical^{90,93,107}.

A persistência do HPV após a conização é amplamente variável^{117,118,119}. Hoffman e colaboradores (2017) em uma revisão sistemática, com 45 estudos e entre 6.106 mulheres, identificaram que a mediana de persistência após o tratamento foi de 13% aos 12 meses e 4% aos 24 meses¹²¹. Outra revisão sistemática com 25 estudos, relatando a incidência de HPV após o tratamento em cerca de 2.000 mulheres, apontou que variou de 0 a 47% (intervalo interquartilico: 0% -15%) em até 3 anos de acompanhamento após o tratamento. Neste estudo, Rositch e seus colegas (2014) concluíram que a menor incidência de HPV foi observada entre os estudos que incluíram mulheres relativamente mais jovens e que usaram a conização a laser¹²².

Mulheres tratadas para lesões de alto grau são consideradas de alto risco para desenvolver câncer de colo uterino durante muitos anos após o tratamento, principalmente nos dois primeiros anos^{12, 90, 123} e, por esta razão, o acompanhamento regular dessas mulheres representa atualmente a melhor estratégia para a detecção precoce de lesões cervicais residuais ou recorrentes (NIC 2+). Não existe consenso mundial sobre a melhor estratégia de vigilância para as mulheres tratadas lesão de alto grau¹²⁴, porém alguns protocolos de acompanhamento europeus são baseados em citologia, apesar da baixa especificidade do exame de Papanicolau^{125,126}. A colposcopia é geralmente realizada durante 6 meses de seguimento¹²⁷ mesmo que isso acrescente pouco em termos de taxa de detecção. Nemosbritânicos e nem as Sociedades Americana de Colposcopia e

Patologia Cervical recomendam colposcopia obrigatória em seguimento¹²⁸.

Estudos têm demonstrado taxas elevadas de falsos negativos para exames de citologia oncológica de seguimento, de 50%^{123,129}. No entanto, uma combinação de testes de citologia e o DNA HPV HR após tratamento tem mostrado uma sensibilidade maior^{130,131}. Em uma metanálise realizada com 11 estudos por Zielinski et al. (2004)¹³² o valor preditivo negativo (VPN) do teste de HPV DNA HR para doença residual/recorrente durante o seguimento foi de 98%, 91% para margens de ressecção e 93% para citologia, mostrando assim alta sensibilidade para detectar CIN2 + após conização.

A presente revisão sistemática tem como fragilidade o número limitado de estudos incluídos e a heterogeneidade dos parâmetros disponíveis. As referências foram os estudos que aplicaram os testes de RNAm HPV no seguimento das mulheres pós-conização, além dessas informações, buscou-se outros marcadores prognósticos e diagnósticos de recorrência. Além dos testes de DNA HPV HR, a citologia (por quatro estudos, menos Zappacosta¹¹³) e as margens cirúrgicas também foram analisadas, no entanto desta vez, dois estudos contemplaram estes dados (Persson¹¹¹ e Tropé¹¹²), limitando as possibilidades de análise. A análise de sensibilidade por ensaio do teste de RNAm não foi possível de ser realizada devido o fato de que quase cada estudo ter usado um ensaio diferente, com apenas dois estudos que realizaram o rastreio utilizando o mesmo kit (Frega et al¹¹⁰ e Tropé et al¹¹²). Tais dificuldades já havia sido enfrentada por outros pesquisadores, como por van der Heijden e colegas e publicada pela Cochrane Database em 2015, quando pesquisou ensaios controlados randomizados que compararam as estratégias de gerenciamento de acompanhamento após LLETZ (*Large Loop Excision da Transformation Zone*, técnica semelhante à conização). Estes concluíram que “não há estudos relevantes comparando HPV HR e teste de citologia com teste de citologia sozinho para detectar doença residual ou recorrente durante o seguimento do tratamento LLETZ de mulheres adultas com NIC”¹³³.

Estudos anteriores focados em ensaios de RNAm HPV na triagem de lesões cervicais mostraram um melhor desempenho em outras situações. Burger et al., em 2011, realizaram uma revisão sistemática incluindo predominantemente estudos de triagem secundária inespecífica¹³⁴, e Verdoodt et al., em 2013, incluíram estudos com citologia cervical com lesões menores (ASC-US e LSIL)¹³⁵. O primeiro

incluiu 11 estudos e concluiu que as sensibilidades variaram de 41,0% a 86,0% e de 90,0% a 95,0% para o teste PreTect Proofer / NucliSENS Easy Q e Aptima, respectivamente. As especificidades variaram de 63,0% a 97,0% e de 42,0% a 61,0% para os mesmos ensaios, respectivamente. Em um estudo realizado por Verdoodt et al., que incluiu 10 estudos utilizando o PreTect Proofer / NucliSENS Easy Q, eles concluíram que a sensibilidade agrupada foi de 75,4% e 76,2% e a especificidade combinada foi de 77,9% e 74,2%, para a triagem de ASC-US e LSIL, respectivamente.

Comparando-se os ensaios de RNAmHPV, DNA HPV HR e citologia nesta revisão sistemática, amostra composta por 1.090 mulheres, identifica-se que os ensaios de RNAmHPV apresentaram a melhor especificidade agrupada, de 91,5% (IC95% 89,5-93,2); Teste de DNA HPV (PCR), melhor sensibilidade agrupada, de 86,8% (IC95% 80,5-91,6); e citologia o melhor equilíbrio entre eles, traduzido na melhor AUC, de 0,9292.

Estudos prospectivos focados na aplicação desses ensaios após a conização não estão disponíveis e são necessários, incluindo parâmetros de custo-efetividade. Em outro cenário, um estudo americano comparando citologia com testes de DNA HPV HR (n = 1.856) ou RNAm de HPV (n = 1.651) em amostras de citologia ASC-US concluiu que a alteração na metodologia de detecção de HPV HR de HC2 para Aptima levou a uma redução de 21% nos encaminhamentos de colposcopia e é mais rentável para o atendimento ao paciente¹³⁶.

Um estudo multicêntrico com 5.006 mulheres submetidas a triagem de rotina na França comparando um teste de HPV RNAm (Aptima), um teste de DNA HPV HR (HC2), genotipagem por PCR e citologia (LBC) já ilustram que o Aptima detecta de 5% a 15% mais lesões CIN2 do que a citologia. Em comparação com o ensaio de HC2, o risco relativo de Aptima foi 24% a 29% superior, com uma diferença significativa na detecção de CIN2 +, concluindo que o Aptima é uma opção adequada para o rastreio do câncer do colo uterino primário¹³⁷.

Levando em consideração etiopatologia oncogenética do HPV na ocorrência de câncer do colo uterino e da elevada sensibilidade do teste de diagnóstico do DNA HPV na detecção de infecção residual/recorrente, tem-se exames positivos com lesão cervical residual regredindo, sem progressão para o câncer. Desta forma, nos testes de DNA-HPV HR os valores preditivos positivos e especificidades tendem a ser menores, criando um desafio de discriminar entre infecções transitórias e

persistentes¹³⁸. Por outro lado, infecção persistentes expressão oncoproteínas E6 / E7 de HPV de forma contínua, causando a transformação e manutenção do estado neoplásico podem ser monitorizados através de teste de RNAm E6 / E7 tendo maior diferenciação do que é infecção transitório ou persistente^{139,140}. Diante dos fatos apresentados do teste DNA HPV HR (alta sensibilidade e baixa especificidade), pode-se facilmente conduzir a exames falsos positivos, resultando em testes excessivos e tratamentos desnecessários fazendo com que incessantemente busque uma técnica mais precisa e confiável¹⁴¹.

Enquanto os testes de RNAm, os valores de sensibilidade apresentam-se mais baixo do que o teste de DNA (análise utilizando quatro estudos) 61.3% (IC95%: 53.2 - 68.8)a especificidade combinada é maior do que a do que o próprio teste de DNA apresentado na Revisão de Zielinski et al. (2004)¹⁴², de 91,5% (IC95%: 89,5 - 93,2). Na coorte realizada por Frega et al (2014)¹¹⁰, a maior coorte realizada e comparada nesta revisão que analisa os testes de DNA e RNAm HPV em mulheres tratadas para NIC 2/3, mostra que durante o seguimento as mulheres que tiveram recidiva de NIC o teste RNAm de HPV apresentou menor sensibilidade e Valor Preditivo Negativo (VPN) que o teste de DNA HPV dos que os demais estudos até então apresentados na literatura. Atribuíram esta diferença por focarem em seus estudos a análise diferencial entre a doença residual da recorrente. Nesta ótica apresentaram valores de sensibilidade para o teste de DNA de 81% (IC95%: 76,9 – 84,2) para as doenças recidivas, de 100% (IC95%: 98,9 – 100,0) para a doença residual e para doença recorrente de 44%(IC95%: 39,3 – 49,1). Para o teste de RNAm HPV os valores da sensibilidade foram: 59.6% (IC95%: 59,6 – 64,0) para as doenças recidivas, 52% (IC95%: 47,5– 57,0) para a doença residual e de 73% (IC95%: 68,9– 77,7) para doença recorrente. A especificidade entre as doenças não apresentou diferenciação nos valores se tratando de residual ou recorrente, sendo que para o teste de DNA foram de 67% e para RNAm foram de 85.6%.

Na coorte de Tropé et al (2011)¹¹² o teste RNAm HPV surpreende-os com baixos valores de sensibilidades (45,5%) e Valor Preditivo Positivo VPP (38,5%), mesmo depois de restringir as análises às mulheres que tinham o teste RNAm positivo antes da conização (a sensibilidade foi de 57,1%). Zhao e Shao (2016)¹¹⁴ assim como nos estudos de Zappacosta et al (2013)¹¹³ apesar de encontrarem valores de sensibilidade para o teste de RNAm maiores que os demais estudos, também atribuem a baixa

sensibilidade ao fato de que é difícil diferenciar com certeza entre doença residual e recorrente, sendo que a sensibilidade relativamente baixa do teste RNAm pode ser devido a baixa expressão das oncoproteínas em infecções novas e transitórias.

A incidência residual e de recorrência de HSIL após a conização depende de fatores de risco definidos. Os fatores de risco identificados para recidivas de NIC após tratamento excisionais são o envelhecimento, a carga viral, grau da lesão, e margens de ressecção positivas^{120,131, 143, 144, 145}. Uma revisão sistemática e metanálise para avaliar o risco de falha terapêutica associada ao estado histológico das margens do tecido excisado para o tratamento do pré-câncer cervical, incluindo 44.446 mulheres, estimou que o risco de NIC residual ou recorrente aumentou com a positividade comparada com negativa margens de ressecção (risco relativo 4,8, IC 95% 3,2-7,2). Para Park et al., a alta carga de HPV HR pré-cone foi o único fator de risco para a persistência de HPV¹⁴⁶. Liu et al., revelaram que entre 1.502 casos, 3,2% sofriam de doença residual HSIL após a conização eram mulheres com idade maior ou igual a 50 anos e margem endocervical positiva foram apontados como fatores de alto risco para a lesão residual de HSIL após a conização¹⁴⁷.

Tropé et al (2011)¹¹², em sua coorte mostra que as mulheres submetidas a conização por NIC2 +e que apresentaram doença residual eram mais velhas (idade média: 43,2 anos) que as mulheres que não apresentaram (idade média: 37,2 anos). O achado está em consonância com a literatura, que demonstra que mulheres com mais de 30 anos tem maior risco de doença residual devido à alteração da imunidade e à seleção positiva ao longo do tempo e, portanto, uma maior probabilidade de doença multifocal persistente no canal cervical.

De forma paradoxal, nos estudos de Zappacosta et al (2013)¹¹³ as mulheres com lesão, durante o seguimento, eram mais jovens do que as mulheres sem recorrência, tendo uma possível razão para este achado a alta incidência de reinfecções, habitualmente associados a probabilidade de maior número de parceiros sexuais e ao uso irregular do preservativo durante as relações. O mesmo achado se deu para Frega et al (2014)¹¹⁰, que concluíram que a idade jovem aumentava o risco de recaída e recorrência, e que os testes de citologia, de DNA e o RNAm alcançaram o papel de preditores independentes tanto de recidiva quanto de doença recorrente, no entanto apenas citologia e teste de HPV DNA foram preditores independentes de doença residual. No estudo de Zhao e Shao¹¹⁴(2016) não houve diferença estatisticamente significativa entre as

taxas de recorrência ou doença residual em relação à idade maior ou menor que 40 anos, indicando que a idade da mulher não estava associada à lesão residual.

Assim como no estudo de Tropé de 2011¹¹² e no estudo de Frega et al. (2014)¹¹⁰ o teste de RNAm HPV não foi positivo em todos os pacientes que tiveram uma doença recorrente. Frega et al (2014)¹¹⁰ encontraram diferentes genótipos do HPV detectados por diferentes testes de RNAm (NorChip e APTIMA), sendo que neste caso, a menor sensibilidade e a maior especificidade do teste de Norchip pode ser devido à detecção do teste de 5 genótipos, em vez de 14 tipos de alto risco detectados pelo ensaio APTIMA. Também é uma hipótese o fato de que mulheres dos estudos com testes negativos de RNAm, mas diagnosticada com um tipo de HPV podem ter tido lesões sem expressão oncogênica e, portanto, mais propensas a regreção espontaneamente das lesões, sem tratamento (no entanto, isso não pode ser investigado pois as diretrizes recomendam o tratamento de todas as mulheres diagnosticadas com lesões NIC2+).

Apesar da descrição das margens de ressecção positivas como fator de risco para recidiva de lesão de alto grau pós tratamento, as coortes de Tropé et al (2011)¹¹² e Persson et al (2012)¹¹¹ foram os únicos estudos desta Revisão Sistemática que a incluíram em suas observações. O status da margem de ressecção não discerniu quais mulheres estavam em risco no seguimento de curto prazo. Tropé et al (2012)¹¹² relataram que quando as margens de ressecção não são livres, a neoplasia remanescente muitas vezes é destruída pela cauterização das margens de ressecção após a conização.

Mediante os achados apresentados neste estudo, onde o teste RNAm HPV tem elevada especificidade 91,5%, permite-se avaliar que a detecção do nível de expressão das oncoproteínas E6 / E7 é mais específico e um melhor indicador de risco de recidiva de lesões de alto grau do colo do útero do que o teste de DNA HPV (que possui a especificidade de 72,4%) e da citologia (especificidade de 87,2%). A elevada especificidade e uma baixa taxa de positividade permitem sugerir que o teste RNAm HPV são uma ferramenta adequada no rastreamento do câncer do colo uterino e no seguimento de mulheres submetidas a conização, podendo prever o risco de lesões residuais / recorrentes após o tratamento excisional (DOR: 30,2 vezes maior de chance de um resultado positivo entre sujeitos com NIC2+ do que em pessoas sem este desfecho, enquanto o teste de DNA HPV a DOR foi de 33,9 e a citologia

a DOR de 19,5). Desta forma diminui resultados falsos positivos (FP nos testes de RNAm foram de 79), exames excessivos e tratamento/intervenções agressivas. Além disso, devido ao seu valor preditivo positivo ser maior que do teste de DNA e da citologia (VPP RNAm: 0,575; DNA: 0,361 e citologia oncótica = 0,463) pode permitir a redução da frequência de acompanhamento, controlando assim os custos, reduzindo o grau de ansiedade e de estresse das mulheres acompanhadas e, quem sabe, até mesmo diminuindo as perda/abandonos dos acompanhamentos/seguimentos.

Pode-se ainda considerar que em países em desenvolvimento, como o caso do Brasil, onde apesar dos rastreamentos e dos seguimentos de mulheres atendidas no Sistema Único de Saúde (SUS) estar bem definido pelas diretrizes, a citologia e a colposcopia são os principais manejos. Sendo assim dependemos de uma triagem fortemente atribuída ao desempenho, treinamento e habilidades humanas, muitas vezes limitadas por falta de mão de obra específica e bem treinada, carentes de exames de maior especificidade e que em custo benefício sinalizem maior grau de evidência para demais intervenções.

6 CONCLUSÃO

Ao comparar os ensaios de RNAm HPV, os ensaios de DNA HPV HR e citologia na amostra composta por 1090 mulheres, foi identificado que os ensaios de RNAm HPV apresentaram uma melhor especificidade combinada de 91,5%, o teste DNA HPV por PCR teve uma melhor sensibilidade agrupada de 86,8% e a citologia teve um melhor equilíbrio entre eles, traduzido na melhor AUC de 0,9292.

Os testes de RNAm podem permitir a redução da frequência de acompanhamento, controlando assim os custos, reduzindo o grau de ansiedade e de estresse das mulheres acompanhadas e até mesmo diminuindo as perdas dos seguimentos.

Em conclusão, este estudo sugere que o teste de RNAm do HPV é uma ferramenta adequada no rastreamento do câncer do colo do uterino e no seguimento de mulheres submetidas à conização, principalmente quando uma alta especificidade é prioridade.

REFERÊNCIAS

1. ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Papillomaviruses: a systematic review. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1-21, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0128>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47572017005003101&script=sci_abstract>. Acesso em: 01 jun. 2017.
2. ROSA, Maria Inês da et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.953-964, maio 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-311x2009000500002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2009000500002>. Acesso em: 01 maio 2017.
3. BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Tipos de Câncer**. 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/coloutero>.
4. GRCE, Magdalena et al. Detection and typing of human Papillomavirus by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. **European Journal of Epidemiology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.645-651, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007323405069>. Disponível em: <<file:///C:/Users/Vaio/Downloads/NinaMilutinGasperov-PatholOncolRes2008.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2017.
5. SILVA FILHO, Alfredo de Moraes e; LONGATTO FILHO, Adhemar. **Colo uterino vagina: Processos inflamatórios**. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
6. ARBYN, Marc et al. Virologic Versus Cytologic Triage of Women With Equivocal Pap Smears: A Meta-analysis of the Accuracy To Detect High-Grade Intraepithelial Neoplasia. **Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], p.280-293, 18 fev. 2004. Quadrimestral. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970277>>. Acesso em: 07 jun. 2017.
7. MOLIJN, Anco et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, [s.l.], p.43-51, mar. 2005. Disponível em:

<[http://www.hu.ufsc.br/projeto_hpv/Molecular diagnosis of human papillomavirus \(HPV\) infections.pdf](http://www.hu.ufsc.br/projeto_hpv/Molecular%20diagnosis%20of%20human%20papillomavirus%20(HPV)%20infections.pdf)>. Acesso em: 07 jun. 2007.

8. STOLER, Mark H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [s.l.], p.935-939, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873164>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

9. DOORBAR, John. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, [s.l.], p.7-15, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753007>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

10. SCHEURER, Michael E.; G, Tortolero-luna; K, Adler-storthz. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, [s.l.], p.727-746, set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103442>>. Acesso em: 07 jun. 2017

11. MUÑOZ, Nubia et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine: Vaccine**, [s.l.], p.1-10, maio 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

12. KANODIA, Shreya; FAHEY, Laura M; KAST, Martin. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. **Current Cancer Drug Targets**, [s.l.], p.79-89, fev. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305480>>. Acesso em: 07 jun. 2017

13. BUCK, Christopher B. et al. Arrang'ement of L2 within the Papillomavirus Capsid. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 2008, n. 06, p.5190-5197, jun. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367526>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

14. FRANCE. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chapter 2: An Introduction to Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). In: J.W. Sellors (Ed.). **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manual**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2003. p. 13-20. Disponível em:

<<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2&lang=1>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

15. MUÑOZ, Nubia et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, [s.l.], p.518-517, fev. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

16. HOWLEY PM, LOWY DR. **Papillomaviruses and their replication. In: Virology**, Vol 2. Fields BN, Knipe JB, Howley PM (eds). Lippincott/The Williams & Wilkins Co: Philadelphia, PA: 2197-2229, 2001.

17. FEHRMANN, F; LAIMINS, LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, [s.l.], p.1-7, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12910257>>. Acesso em: 09 jun. 2017

18. ZUR HAUSEN, Harald. Viruses in human cancers. **Science**, [s.l.], p.1167-1173, nov. 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659743>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

19. ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], p.690-698, maio 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793105>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

20. JEON, Saewha; LAMBERT, D Paul F. 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 Usa** **92**, [s.l.], p.1654-1658, fev. 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878034>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

21. VILLA, Luisa Lina. Human Papillomaviruses and cervical Cancer. **Advence In Cancer Research**, [s.l.], p.321-341, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111869>>. Acesso em: 11 jun. 2017.

22. OZBUN, Michelle A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. **Journal Of Virology**, [s.l.], p.11291-11300, nov. 2002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388689>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

23. THOMAS, Miranda; BANKS, Lawrence. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. **Journal Of General Virology**, [s.l.], p.1513-1517, jun. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374970>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

24. SCHEFFNER, Martin; WHITAKER, Noel J. Human papillomavirus induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. **Seminars in Cancer Biology**, [s.l.], p.59-67, fev. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507557>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

25. KLINGELHUTZ, A J; FOSTER, S A; MCDOUGALL, J K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, [s.l.], p.79-82, mar. 1996. Disponível em: <Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16.>. Acesso em: 12 jun. 2017.

26. VELDMAN, Tim et al. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proc Natl Acad Sci, U.s.a.**, p.8211-8216, jul. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC166208/pdf/1008211.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

27. ROSA, MI et al. Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review. **International Journal of Gynecological Cancer**, [s.l.], p.1205-1214, nov. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-1438.2007.00980.x/epdf>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

28. NAKAO, y et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. **British Journal of Cancer**, [s.l.], p.1410-1416, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9166931>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

29. SANO, Takaaki et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **American Journal of Pathology**, [s.l.], p.1741-1748, dez. 1998. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846965>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

30. BEAUSÉJOUR, Christian M. et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 na p16 pathways. **The Embo Journal**, [s.l.], p.4212-4222, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912919>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

31. WENTZENSEN, Nicolas; DOEBERITZ, Magnus von Knebel. Biomarkers in cervical cancer screening. **Disease Markers**, [s.l.], p.315-330, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627065>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

32. MURPHY, N et al. P16INK4A, CDC6, and MCM5:: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. **J Clin Pathol**, [s.l.], p.525-534, maio 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858126>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

33. CUSCHIER, Kate; WENTZENSEN, Nicolas. Human papillomavirus m RNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, [s.l.], p.2536-2545, out. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900792/>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

34. DUENSING, Stefan et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Proc Natl Acad Sci**, U.s.a, p.10002-10007, ago. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10944189>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

35. ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews – Cancer**, [s.l.], p.342-350, maio 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

36. PARKIN, D Maxwell. Global cancer statistics in the year 2000. **The Lancet Oncology**, [s.l.], p.533-543, set. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905707>>. Acesso em: 07 jul. 2017.

37. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CÂNCER (IARC). **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>>. Acesso em: 07 jul. 2017.
38. TORRE, Lindsey A. et al. Global cancer statistics, 2012. **Ca: A Cancer Journal For Clinicians**, [s.l.], p.87-108, mar. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651787>>. Acesso em: 07 jul. 2017.
39. TROTTIER, Helen; FRANCO, Eduardo L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, [s.l.], p.1-5, mar. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406226>>. Acesso em: 12 jul.
40. BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Incidência de Câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 04 jan. 2018.
41. SCHIFFMAN, M H et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, [s.l.], p.958-964, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388478>>. Acesso em: 01 ago. 2017.
42. HILDESHEIM, Allan; WANG, Sophia S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Research**, [s.l.], p.229-240, nov. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445662>>. Acesso em: 07 jul. 2017.
43. FRAZER, I. Correlating immunity with protection for HPV infection. **J Infec Dis**, [s.l.], p.10-16, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162240>>. Acesso em: 01 ago. 2017.
44. SILVA, Terezinha Tenório da. **Fatores de risco para neoplasia intraepitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV**. 2004. 130 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Medicina Tropical, Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2004. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/7248/1/arquivo8079_1.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2017.

45. CDC – A Centers for Disease Control and Prevention – Prevention of Genital Human papillomavirus Infection. Gerberding JL (Director) Department of Health and Human Services. Report to Congress 2004.
46. DEMAY, Richard Mac. **The Pap Test: Exfoliative Gynecologic Cytology**. Chicago: American Society Clin Pathol, 2005. 500 p.
47. MATSUMOTO, K et al. Predicting the Progression os Cervical Lesionss by Human Papillomavirus genotyping:a prospective cohort study. **Int J Cancer**, [s.l.], p.2898-2910, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734388>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
48. SMITH, S J et al. Human Papillomavirus Type distribution in Invasive Cervical Cancer and High- grade Cervical Lesions: a meta-analysis updatw. **Int J Cancer**, [s.l.], p.621-632, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.22527>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
49. FRANCE. IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Human Papillomaviruses: Molecular Mechanisms of HPV-induced Carcinogenesis**. 2. ed. Lyon, 2007. 689 p. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-9.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
50. KHAN, Michelle J. 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. **Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], p.1072-1079, jul. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030305>>. Acesso em: 07 jul. 2017.
51. ABRÃO, F.S, **Tratado de Oncologia Genital e Mamária**, 1ª Ed, Editora Roca, São Paulo, 1995.
52. SOUZA, Néli Sueli Teixeira de; MELO, Victor Hugo do; CASTRO, L'cia Porto Fonseca de. Diagnóstico da Infecção pelo HPV em Lesões do Colo do Útero em Mulheres HIV+:Acuidade da Histopatologia. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, [s.l.], p.355-361, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v23n6/11331.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

53. HUBBARD, Roger A. Human papillomavirus testing methods. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [s.l.], p.940-945, ago. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873165>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
54. VILLA, Luisa Lina; DENNY, Lynette. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal Of Gynecology And Obstetrics**, [s.l.], p.71-80, nov. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020729207600137>>. Acesso em: 21 jul. 2017.
55. JEANTET, Damien et al. NucliSENS® EasyQ® HPV v1 test Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. **Journal Of Clinical Virology**, [s.l.], p.29-37, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651366>>. Acesso em: 20 jul. 2017.
56. LORETO, C D. Papilomavírus em saúde pública: importância da aplicação de novos critérios morfológicos para sua detecção em trato genital feminino. **Bol. Inform**, [s.l.], p.24-39, 1992.
57. GOMPEL, Claude; KOSS, Leopold G; WULKAN, Ignacy. **Citologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo: Manole, 1997. 112 p.
58. CAVALCANTI, Silvia Mb; CARESTIATO, Fernanda N. Infecções Causadas Pelos Papilomavírus Humanos: Atualização Sobre Aspectos Viroológicos, Epidemiológicos E Diagnóstico. **Dst – J Bras Doenças Sex Transm**, [s.l.], p.73-79, 2006. Disponível em: <<http://www.dst.uff.br/revista18-1-2006/14.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2017.
59. SILVA, Ismael Dale Cotrim Guerreiro da. Métodos e diagnósticos. In: CARVALHO, Julio José Maximo de (Org.). **Atualização em HPV: Abordagem Científica e Multidisciplinar**. 2. ed. São Paulo: Instituto Garnet, 2012. p. 45-69.
60. NAYAR, Ritu; WILBUR, David C. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes**. 3. ed. U.s.a: Springer, 2014. 24 p. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/bfm:978-3-319-11074-5/1.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2017.
61. SASLOW, Debbie 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. **Ca Cancer J Clin**, [s.l.], p.1-43, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3801360/pdf/nihms433131.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2017.
62. KARNON, J et al. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. **Health Technol Assess**, [s.l.], p.1-78, maio 2004. Disponível em: <<https://www.journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/hta8200/#/abstract>>. Acesso em: 25 jul. 2017.
63. LONGATTO-FILHO, Adhemar et al. Critical Analyses of the Introduction of Liquid-Based Cytology in a Public Health Service of the State of São Paulo, Brazil. **Acta Cytologica**, [s.l.], p.273-277, 2015. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Pdf/435801>>. Acesso em: 28 jul. 2017.
64. ARBYN, Marc et al. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. **Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], p.167-177, jan. 2008. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-200801000-00023>>. Acesso em: 27 jul. 2017.
65. SCAPULATEMPO, C et al. The Significance of Augmented High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Detection on Pap Test Examination: The Significance of Augmented High-Grade Squamous Intraepithelial Partial Results from the RODEO Study Team. **Acta Cytologica**, [s.l.], p.489-494, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135251>>. Acesso em: 29 jul. 2017
66. SHERMAN, Mark E. et al. Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. **Cancer Citopathology**, [s.l.], p.89-97, 1997. Disponível em: <file:///C:/Users/Vaio/Downloads/Sherman_et_al-1997-Cancer_Cytopathology.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2017.
67. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. - Rio de Janeiro: INCA, 2006. 65 p.
68. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e

Vigilância. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. 2. ed. Rio de Janeiro, 2016. 112 p.

69. HAMMES, Luciano Serpa. **Correlação de achados colposcópicos e diagnóstico histológico segundo a classificação colposcópica da federação internacional de patologia cervical e colposcopia**. 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Curso de Pós Graduação de Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/6404/000441182.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

70. HEATLEY, M. K.; BURY, J. P. The correlation between the grade of dyskaryosis on cervical smear, grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) on punch biopsy and the final histological diagnosis on cone biopsies of the cervix. *Cytopathology*. **Cytopathology**, [s.l.], p.93-99, abr. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577735>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

71. WAXMAN, Alan G. et al. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. **Obstet Gynecol**, [s.l.], p.1465-1471, dez. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054813/pdf/nihms586606.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

72. CUZICK, Jack et al. Long-term follow-up of cervical abnormalities among women screened by HPV testing and cytology. Results from the Hammer Smith study. **International Journal Cancer**, [s.l.], p.2294-2300, maio 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240149>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

73. SCHIFFMAN, Mark et al. Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. **J Natl Cancer Inst**, [s.l.], p.368-383, mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282563>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

74. CLAVEL, C et al. Hybrid capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], p.1306-1311, jul. 1999. Disponível em:

- <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424730>>. Acesso em: 01 ago. 2017.
75. MULLIS, Kary B; FALOONA, Fred. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzimol**, [s.l.], p.335-350, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431465>>. Acesso em: 01 ago. 2017.
76. SILVA, Baldez da et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], p.1437-1443, dez. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20013657>>. Acesso em: 06 jun. 2017.
77. MIRANDA, P.m. et al. Human papillomavirus infection in Brazilian women with normal cervical cytology. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], p.1752-1761, jun. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843052>>. Acesso em: 06 jun. 2017.
78. MUNOZ, Marina et al. Human papillomavirus detection from human immunodeficiency virus-infected colombian women´s paired urine and cervical sample. **Plos One**, [s.l.], p.565-569, fev. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418581>>. Acesso em: 03 ago. 2017.
79. MARTINS, Toni Ricardo. **Citologia líquida e teste molecular para HPV de alto risco: Avaliação de Novas Modalidades de Rastreamento para Prevenção de Câncer de Colo do Útero na Rede Pública de Saúde do Estado de São Paulo**. 2016. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/Vaio/Downloads/ToniRicardoMartins (1).pdf>. Acesso em: 01 maio 2017.
80. MCNICOL, Anne M; FARQUHARSON, Maura A. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. **Journal of Pathology**, [s.l.], p.250-261, jul. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9349226>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
81. LAU, J; LOANNIDIS, J P; SCHMID, C H. Summing up evidence: one answer is not always enough. **Lancet**, [s.l.], p.123-127, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9439507>>. Acesso em: 01 maio 2017.

82. DALSTEIN, Véronique et al. Analytical evaluation of the Pappilochek test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, [s.l.], p.77-83, mar. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041893>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
83. MEIRA, Helena Rabelo Castro. **Fatores de risco para recidiva da neoplasia intraepitelial cervical após cirurgia de alta frequência**. 2014. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Medicina, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-A8QNA6/tese_fatores_de_risco.docx5.pdf?sequence=1>. Acesso em: 01 maio 2017.
84. WRIGHT JUNIOR, Thomas C. et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. **American Journal Of Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], p.346-355, out. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17904957>>. Acesso em: 30 ago. 2017.
85. UEDA, Masatsugu et al. Diagnostic and therapeutic laser conization for cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, [s.l.], p.143-146, abr. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271274>>. Acesso em: 30 ago. 2017.
86. CAMPANER, Adriana Bitencourt et al. Ginecologia. In: CARVALHO, Julio José Maximo de (Org.). **Atualização em HPV: Abordagem Científica e Multidisciplinar**. 2. ed. São Paulo: Instituto Garnet, 2012. Cap. 7. p. 99-180.
87. FRANCE. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Treatment of cervical intraepithelial neoplasia by loop electrosurgical excision procedure (LEEP). In: J.W. Sellors (Ed.). **Colposcopy and treatment of cervical intraepithelial neoplasia: a beginners' manua**. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2003. p. 13-20. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?chap=2&lang=1>>. Acesso em: 28 jul. 2017.
88. TERRES, Adelar Ferreira et al. Correlação dos aspectos comportamentais e epidemiológicos entre mulheres com câncer do colo

do útero e mulheres com colpocitologia oncótica negativa. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, [s.l.], p.103-109, 2009. Disponível em: <www2.pucpr.br/reol/index.php/BS?dd1=4638&dd99=view>. Acesso em: 30 ago. 2017.

89. LIMA, Maria Inês de Miranda et al. Conização com cirurgia de alta frequência na neoplasia intraepitelial cervical: quando usar a alça de canal? **Femina**, [s.l.], p.183-188, abr. 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n4/a2479.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

90. SYRJÄNEN, K et al. Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. **Obstet Gynecol**, [s.l.], p.675-682, maio 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1314359>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

91. PARASKEVAIDIS, e et al. The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment of CIN: a systematic review of the literature. **Cancer Treat Rev**, [s.l.], p.205-211, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023438>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

92. NARDUCCI, F et al. Positive margins after conization and risk of persistent lesion. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.311-314, 1999.

93. PARASKEVAIDIS, E et al. Large loop excision of the transformation zone for treating cervical intraepithelial neoplasia: a 12-year experience. **Anticancer Res**, [s.l.], p.3097-3099, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712817>>. Acesso em: 15 jul. 2017

94. COSTA, S et al. Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.119-124, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11925130>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

95. TYLER, L N et al. Significance of margin and extent of dysplasia in loop electrosurgery excision procedure biopsies performed for high-grade squamous intraepithelial lesion in predicting persistent disease. **Arch Pathol Lab Med**, [s.l.], p.622-624, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Significance+of+margin+and+extent+of+dysplasia+in+loop+electrosurgery+excision+procedure+biopsies+performed+for+high->

grade+squamous+intraepithelial+lesion+in+predicting+persistent+disease>. Acesso em: 07 ago. 2017.

96. SERATI, M et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization: a 10-year study. **Eur J Obstet Gyn Rep Biol**, [s.l.], p.86-90, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Risk+factors+for+cervical+intraepithelial+neoplasia+recurrence+after+conization%3A+a+10-year+study>>. Acesso em: 05 jul. 2017.

97. SHAMSEER, Larissa et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. **The Bmj**, [s.l.], p.1-25, 2014. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/349/bmj.g7647>>. Acesso em: 03 set. 2017.

98. LIBERATI, Alessandro et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **The Bmj**, [s.l.], p.1-34, 2009. Disponível em:

<<https://search.proquest.com/openview/ea71df63a43562bf91c4aa61b4a08b46/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1436338>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

99. WHITING, Penny F. et al. QUADAS-2: A Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies. **Research and Reporting Methods**, [s.l.], p.529-536, out. 2011. Disponível em: <<file:///C:/Users/Vaio/Downloads/0000605-201110180-00009.pdf>>. Acesso em: 09 set. 2017.

100. SCHUELER, Sabine; SCHUETZ, Georg M.; DEWEY, Marc. The revised QUADAS-2 tool. **Ann Intern Med**, [s.l.], p.156-323, 21 fev. 2012. Disponível em: <<http://annals.org/aim/article-abstract/1132666/revised-quadas-2-tool?doi=10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00018>>. Acesso em: 09 set. 2017.

101. DEVILLÉ, Walter L et al. Conducting systematic reviews of diagnostic studies: didactic guidelines. **Bmc Med Res Methodol**, [s.l.], p.2-9, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097142>>. Acesso em: 06 jan. 2018.

102. ZAMORA, Javier et al. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. **Bmc Medical Research Methodology**, [s.l.], p.1-12, 2006. Disponível em: <<https://bmcmredsmethodol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2288-6-31>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

103. REITSMA, Johannes B. et al. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. **J Clin Epidemiol.**, [s.l.], p.982-990, 2005. Disponível em: <[https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356\(05\)00162-9/pdf](https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356(05)00162-9/pdf)>. Acesso em: 27 mar. 2018.
104. HIGGINS, Julian P. T.; THOMPSON, Simon G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statist. Med.**, [s.l.], p.1539-1558, jun. 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sim.1186/epdf>>. Acesso em: 09 set. 2017.
105. DEEKS, Jonathan J. Systematic reviews of evaluations of diagnostic and screening tests. **Bmj**, [s.l.], p.157-162, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1120791/pdf/157.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2018.
106. KNOTTNERUS, JA; MURIS, Jw. Assessment of the accuracy of diagnostic tests: the cross-sectional study. **J Clin Epidemiol**, [s.l.], p.1118-1128, 2003. Disponível em: <[https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356\(03\)00206-3](https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356(03)00206-3)>. Acesso em: 27 mar. 2018.
107. BERWANGER, Otávio et al. Como avaliar criticamente revisões sistemáticas e metanálises? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.475-480, dez. 2007. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-507x2007000400012>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbti/v19n4/a12v19n4.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2018.
108. ZHOU, Xiao Hua; OBUCHOWSKI, Nancy A.; MCCLISH, Donna K. Statistical methods in diagnostic medicine. **2002**. New York, p.15-56, 2002.
109. DERSIMONIAN, Rebecca; LAIRD, Nan. Meta-analysis in clinical trials. **Control Clin Trials**, [s.l.], p.177-188, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802833>>. Acesso em: 16 mar. 2018.
110. FREGA, Antonio et al. Assessment of HPV-mRNA test to predict recurrent disease in patients previously treated for CIN2/3. **Journal Ofclinicalvirology**, [s.l.], p.39-43, 2014. Disponível em: <[https://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532\(14\)00037-7/pdf](https://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(14)00037-7/pdf)>. Acesso em: 12 maio 2017.

111. PERSSON, Maria et al. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA and L1 DNA as markers of residual/recurrent cervical intraepithelial neoplasia. **Oncology Reports**, [s.l.], p.346-352, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484610>>. Acesso em: 01 maio 2017.
112. TROPÉ, Ameli et al. Role of high-risk human papillomavirus (HPV) mRNA testing in the prediction of residual disease after conisation for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, [s.l.], p.257-262, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839500>>. Acesso em: 01 maio 2017.
113. ZAPPACOSTA, Roberta et al. Detection of Residual/Recurrent Cervical Disease after Successful LEEP Conization: the Possible Role of mRNA-HPV Test. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], p.1450-1457, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23016778>>. Acesso em: 01 maio 2017.
114. ZHAO, Hua; SHAO, HuaShao. HPV E6/E7 mRNA 检测对宫颈锥切术后病灶残留和复发的诊断价值. **J Cent South Univ (med Sci)**, [s.l.], p.606-611, 2016. Disponível em: <<http://www.csumed.org/xbwk/CN/abstract/abstract3674.shtml>>. Acesso em: 01 maio 2017.
115. WALBOOMERS, Jan M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, [s.l.], p.12-19, 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291096-9896%28199909%29189%3A1%3C12%3A%3AAID-PATH431%3E3.0.CO%3B2-F>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
116. ALONSO, Immaculada et al. High-risk cervical epithelial neoplasia grade 1 treated by loop electrosurgical excision: follow-up and value of HPV testing. **Am J Obstet Gynecol**, [s.l.], p.359-365, 2007. Disponível em: <[https://www.ajog.org/article/S0002-9378\(07\)00094-4/pdf](https://www.ajog.org/article/S0002-9378(07)00094-4/pdf)>. Acesso em: 03 mar. 2018.
117. OSTÖR, AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. **International Journal of Gynecological Pathology**, [s.l.], p.186-192, 1993. Disponível em: <<https://europepmc.org/abstract/med/8463044/reload=2>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

118. SARIAN, LO et al. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). **J Clin Virol**, [s.l.], p.270-274, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494268>>. Acesso em: 15 ago. 2017
119. BAE, JH et al. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. **Int J Gynecol Cancer**, [s.l.], p.1271-1277, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442018>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
120. COSTA, S. Factors predicting human papillomavirus clearance in cervical intraepithelial neoplasia lesions treated by conisation. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.358-365, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893200>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
121. HOFFMAN, Sarah R. et al. Patterns of persistent HPV infection after treatment for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): A systematic review. **Int J Cancer**, [s.l.], p.1-27, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28124442>>. Acesso em: 03 mar. 2018.
122. ROSITCH, Anne F. et al. The incidence of human papillomavirus infection following treatment for cervical neoplasia: a systematic review. **Gynaecological Oncology**, [s.l.], p.767-779, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412508>>. Acesso em: 03 mar. 2018.
123. PARASKEVAIDIS, e et al. Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstetrics & Gynecology**, [s.l.], p.833-836, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0029784401015356>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
124. KOCHEN, M et al. Risk of recurrent high-grade cervical intraepithelial neoplasia after successful treatment: a long-term multi-cohort study. **Lancet Oncol**, [s.l.], p.441-450, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530398>>. Acesso em: 18 ago. 2017.
125. ARBYN, Marc et al. European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition-summary document. **Ann Oncol**, [s.l.], p.448-458, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176693>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

126. ALONSO, Immaculada et al. Pre- and postconization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.631-636, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16780934>>. Acesso em: 07 ago. 2017.

127. JORDAN, J et al. European guidelines for clinical management of abnormal cervical cytology, part 2. **Cytopathology**, [s.l.], p.5-16, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133067>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

128. BENCHIMOL, Yehouda; MERGUI, Jean-luc; UZAN, Serge (Ed.). The role of viral HPV testing in post-operative follow-up. In Taylor and Francis Eds. HPV handbook. Current evidence-based applications. In: PRENDIVILLE, Walter; DAVIES, Philip. **HPV HANDBOOK: 2: CURRENT EVIDENCE-BASED APPLICATIONS**. New York: Taylor And Francis, 2005. Cap. 4. p. 1-97. Disponível em: <http://www.zervita.de/gfx_content/Dokumente/HPVHandbook2.pdf#page=54>. Acesso em: 11 jan. 2018.

129. JEONG, NH et al. High-risk human papillomavirus testing for monitoring patients treated for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **J Obstet Gynaecol Res**, [s.l.], p.706-711, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751331>>. Acesso em: 07 ago. 2017.

130. ZIELINSKI, G. Denise et al. HPV testing can reduce the number of follow-up visits in women treated for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.67-73, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14529664>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

131. VERGUTS, J et al. Prediction of recurrence after treatment for high-grade cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus testing and age at conisation. **Bjog**, [s.l.], p.1303-1307, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978225>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

132. ZIELINSKI, G. Denise et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-

- analysis. **Obstet Gynecol Surv**, [s.l.], p.543-553, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199273>>. Acesso em: 07 mar. 2018.
133. van der HEIJDEN, E et al. Follow-up strategies after treatment (large loop excision of the transformation zone (LLETZ)) for cervical intraepithelial neoplasia (CIN): Impact of human papillomavirus (HPV) test. **Cochrane Database Syst Rev**, [s.l.], p.1-26, 2015. Disponível em: <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD010757.pub2/full>>. Acesso em: 17 mar. 2018.
134. BURGER, EA et al. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. **Gynecol Oncol**, [s.l.], p.430-438, 2011. Disponível em: <[https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258\(10\)00839-5/fulltext](https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258(10)00839-5/fulltext)>. Acesso em: 06 jan. 2018.
135. VERDOODT, Freija et al. Triage of women with minor abnormal cervical cytology: meta-analysis of the accuracy of an assay targeting messenger ribonucleic acid of 5 high-risk human papillomavirus types. **Cancer Cytopathol**, [s.l.], p.675-687, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncy.21325>>. Acesso em: 06 jan. 2018.
136. SAUTER, JL et al. Testing of Integrated Human Papillomavirus mRNA Decreases Colposcopy Referrals: Could a Change in Human Papillomavirus Detection Methodology Lead to More Cost-Effective Patient Care? **Acta Cytologica**, [s.l.], p.162-166, 2014.
137. MONSONEGO, L et al. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening. **Gynaecological Oncology**, [s.l.], p.175-180, 2012. Disponível em: <[https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258\(12\)00006-6/fulltext](https://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090-8258(12)00006-6/fulltext)>. Acesso em: 06 jan. 2018.
138. ZAPPACOSTA, R; ROSINI, S. Cervical Cancer Screening: From Molecular Basis to Diagnostic Practice, Going Through New Technologies. **Technol In Cancer Res And Treat**, [s.l.], p.161-174, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473488>>. Acesso em: 07 mar. 2018.
139. CUSCHIERI, K; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, [s.l.], p.2536-

- 2545, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842994>>. Acesso em: 07 ago. 2017.
140. SCHWEIZER, J et al. Feasibility study of a human papillomavirus E6 oncoprotein test for diagnosis of cervical precancer and cancer. **J Clin Microbio**, [s.l.], p.4646-4648, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926711>>. Acesso em: 15 jul. 2017.
141. CHEN, Guandi; QIAN, Deying; CHEN, Jianmin. The regression law of high risk human papilloma virus after treatment of High level cervical squamous intraepithelial lesions. **Chinese Journal Of Practical Gynecology And Obstetrics**, [s.l.], p.42-44, 2011
142. ZIELINSKI, G. Denise et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. **Obstet Gynecol Surv**, [s.l.], p.543-553, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199273>>. Acesso em: 07 mar. 2018.
143. SARIAN, LO et al. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). **J Clin Virol**, [s.l.], p.270-274, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494268>>. Acesso em: 15 ago. 2017
144. BAE, Jh et al. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. **Int J Gynecol Cancer**, [s.l.], p.1271-1277, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442018>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
145. WU, D et al. Prediction of residual/recurrent disease by HPV genotype after loop excision procedure for high-grade cervical intraepithelial neoplasia with negative margins. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, [s.l.], p.114-118, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466511>>. Acesso em: 27 jun. 2017.
146. PARK, JY et al. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. **Gynaecological Oncology**, [s.l.], p.549-554, 2008. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177929>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

147. LIU, Li et al. Role of E6/E7 mRNA in discriminating patients with high-risk human papilloma virus-positive associated with cytology-negative and atypical squamous cells of undetermined significance. **Biomedical Research**, [s.l.], p.3986-3990, 2017. Disponível em: <<http://www.alliedacademies.org/articles/role-of-e6e7-mrna-in-discriminating-patients-with-highrisk-human-papilloma-viruspositive-associated-with-cytologynegative-and-atyp.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.