

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À  
FARMÁCIA

PAULA REGINA BACH NOGARA

Distribuição dos genótipos de HPV e integração dos HPV 16/18 em mulheres  
da região sul do Paraná/Brasil com anormalidades cervicais

Maringá  
2011

PAULA REGINA BACH NOGARA

Distribuição dos genótipos de HPV e integração dos HPV 16 e 18 em mulheres da região sul do Paraná/Brasil com anormalidades cervicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia  
Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Edilaine Lopes Consolaro

Maringá  
2011

# FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA REGINA BACH NOGARA

Distribuição dos genótipos de HPV e integração dos HPV's 16 e 18 em mulheres da região sul do Paraná/Brasil com anormalidades cervicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcia Edilaine Lopes Consolaro  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cintia Gandolfi Boer  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Fiorini  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvyia Stuchi Maria-Engler  
Universidade Estadual de São Paulo

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jorge Juarez Vieira Texeira  
Universidade Estadual de Maringá

Local de defesa: Anfiteatro, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá  
DEDICATÓRIA

A minha família, que com  
carinho e estímulo, me  
incentivou a esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força de vontade e por ter-me concedido o privilégio do discernimento e potencial para a realização de mais uma conquista.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dra. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, pelo grande empenho apoio, compreensão, dedicação e paciência dedicados à mim durante este período de estudos, e acima de tudo agradeço pela grande amizade e carinho com que me recebeu em seu laboratório.

Ao meu marido Enio, pelo incentivo e compreensão nos vários momentos em que tive que escolher a pesquisa, prestando sempre seu amor e seu apoio. Agradeço também a minha filha Maísa e a toda minha família pela compreensão dos momentos ausentes de seu convívio para que pudesse realizar este trabalho.

A administração do Consórcio Municipal de Saúde (CISVALI) pela oportunidade da realização das coletas para esta pesquisa, a Dra. Vanúcia M. Serrano, pela amizade que conquistamos durante a execução das coletas, bem como pela dedicação ao colocar a disposição seu conhecimento que foi muito importante para meu crescimento profissional. Agradeço também a enfermeira Marili T. Brusque, pela amizade e pela ajuda no momento das coletas.

Aos professores, funcionários e amigos do laboratório de Citologia Clínica, muito obrigada por fazerem parte desse período importante da minha vida, por contribuírem para realização deste trabalho tanto com a ajuda técnica, quanto com a amizade de todos. Agradeço também aos colegas e professores dos laboratórios de Microbiologia pela permissão ao uso de seus equipamentos para a realização desta pesquisa.

## EPÍGRAFE

A ciência contribui para a clareza.  
Com a condição de que nós, os  
cientistas, de antemão a possuamos.

(MAX WEBER)

## Distribuição dos genótipos de HPV e integração dos HPV 16/18 em mulheres da região sul do Paraná/Brasil com anormalidades cervicais

### RESUMO

A identificação dos tipos de *Papilomavirus* Humano (HPV) de alto risco (HR) oferece a possibilidade de melhorar a eficiência dos programas de rastreamento do câncer cervical. A identificação de fatores que modulam o risco de progressão da doença podem servir como biomarcadores preditivos. O objetivo do presente estudo foi determinar através da técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), a distribuição de genótipos do HPV e a interrupção do gene E2 dos HPV16/18 para avaliar se a integração viral total está correlacionada com o grau de anormalidades cervicais em mulheres Sul do Brasil. Um total de 137 mulheres foram estudadas entre novembro de 2009 e agosto de 2011. As amostras foram coletadas no ambulatório de colposcopia de União da Vitória-PR. A idade média foi de  $33,60 \pm 30,72$  anos (variação 16-78 anos), sendo as mulheres com carcinoma invasivo (IC) relativamente mais velhas ( $p < 0,05$ ). A prevalência do total de DNA-HPV, HR-HPV e múltiplas infecções foi de 56,2%, 38,7% e 12,4%, respectivamente, e foram mais prevalentes em pacientes com lesões de alto grau (HSIL) e carcinomas invasores (IC) ( $p < 0,05$ ). O genótipo mais comumente detectado foi HPV-16 (17,5%;  $p < 0,05$ ). Os HPVs de baixo risco (LR-HPV) foram detectados em 29,2% dos casos, sendo HPV-72 o mais comum (15,3%), sendo que os genótipos 6 e 11 não foram detectados na população estudada. As infecções múltiplas mais prevalentes foram entre os HPVs 72 e 16 (64,7 % de todas as co-infecções e 8,0% das mulheres). A interrupção total do gene E2 do HPV 18 foi de 100% e esta infecção foi distribuída uniformemente em atipias (ASC-H), lesões de baixo grau (LSIL), HSIL e IC (0,7% cada). Para o gene E2 do HPV 16, a interrupção total foi de 54,2% e ocorreu em 50,0% das atipias (ASC), 66,7% em LSIL, 53,8% em HSIL e 50% em IC ( $p > 0,05$ ). Considerando os resultados semelhantes para a integração total do HPV-16 entre os diferentes graus de anormalidades citológicas, desde ASC até IC, o uso da PCR não parece ser aplicável para distinguir as mulheres com maior propensão para a progressão das lesões.

**Palavras-chave:** DNA-HPV. Genótipos. Integração. Anormalidades citológicas.

## Distribution of HPV genotypes and integration of HPV 16 / 18 in women of south region of the Paraná/Brasil with cervical abnormalities

### **ABSTRACT**

The identification of high-risk (HR) Human *Papillomavirus* (HPV) types offers the possibility of improving the efficiency of cervical screening programs. Therefore, there is a continuing need for the identification of factors that modulate the risk of disease progression, and which might serve as predictive biomarkers. The aim of the present study was determine by polymerase chain reaction (PCR) the distribution of HPV genotypes and the E2 gene disruption of the HPV16/18 to assess whether viral pure integration is correlated with the degree of cervical abnormalities in South Brazilian women. A total of 137 women were studied between November 2009 and August 2011, cervical samples were collected in the colposcopy clinic at União da Vitória city, south/Brazil. The mean age was  $33.60 \pm 30.72$  years (range of 16-78 years), and those with invasive carcinoma (IC) were older ( $p < 0.05$ ). The prevalence of total DNA- HPV, HR-HPV and multiple infections in all women was 56.2%, 38.7% and 12.4%, respectively and were higher detected in those with high-grade lesions (HSIL) and invasive carcinomas (IC) ( $p < 0.05$ ). The most common HPV detected types was HPV-16 (17.5%;  $p < 0.05$ ). The low-risk (LR)-HPV types were detected in 29.2%, being HPV-72 the most common (15.3%) and HPV-6 and -11 were not detected. For multiple infections, the most common occurred between HPV-72 and 16 (64.7% the all co-infections and 8.0% of the women). The overall HPV-18 E2 gene disruption was 100.0% and this infection was evenly distributed in atypia (ASC-H), low-grade lesions (LSIL), HSIL and IC (0.7% each). For HPV-16 E2 gene, the overall disruption was 54.2%, and occurred in 50.0% in ASC, 66.7% in LSIL, 53.8% in HSIL and 50% in IC ( $p > 0.05$ ). Considering the similar results for pure integration of HPV-16 among different degrees of cytological abnormalities since ASC to IC, the use of PCR does not seem to be applicable to distinguish women with greater propensity for progression of the lesions.

**Keywords:** DNA-HPV. Genotypes. Integration. Cytologic abnormalities.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Prevalência de HPV-16 e interrupção total do gene E2 em diferentes graus de anormalidades cervicais. A ausência da amplificação do gene E2 foi considerado um sinal da interrupção da região E2 e integração viral total .....31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição de HPV e genótipos de acordo com os achados citológicos.....	29
--	----

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *International Journal of Gynecology and Obstetric*. Disponível em: [http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/506037/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506037/authorinstructions)

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I .....	13
1.1	Epidemiologia do Câncer Cervical .....	13
1.2	Lesões pré-cancerosas e Carcinoma Cervical .....	14
1.3	Papillomavirus Humano (HPV) e a Carcinogênese Cervical .....	15
1.4	Diagnóstico do HPV .....	17
1.5	Justificativas.....	18
1.6	Objetivos .....	18
1.7	Referências Bibliográficas .....	18
2	CAPÍTULO II .....	23
2.1	Distribution of HPV genotypes and integration of HPV 16/18 in South Brazilian women with cervical abnormalities .....	24
3	CAPÍTULO III .....	33
3.1	Conclusões .....	33
3.2	Perspectivas Futuras .....	34
	Anexos .....	35
	Guide for authors: revista International Journal of Gynecology .....	36

## CAPÍTULO I

### EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

Os carcinomas do trato anogenital, particularmente o câncer cervical, são responsáveis por quase 12% de todos os carcinomas na mulher, e por isso, representam a sexta maior causa de neoplasia ginecológica no Brasil, sendo evitável e curável se detectado precocemente por se desenvolver de maneira lenta e previsível [1].

O câncer cervical é o segundo tipo mais comum em mulheres no mundo, precedido apenas pelo câncer de mama, sendo a segunda causa de morte por esta doença no mundo e a primeira nos países em desenvolvimento, onde aproximadamente 500.000 novos casos são estimados por ano no mundo [2]. As taxas de incidência são relativamente baixas nos países desenvolvidos e varia entre diferentes regiões do mundo, sendo inferiores a 14 casos para cada 100.000 mulheres [2, 3]. No Brasil, o número de novos casos estimados para o ano de 2011 é de 18.430. Somente no Estado do Paraná, esta taxa varia de 21 a 23 casos por 100.000 mulheres [1, 3, 4].

Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que em países desenvolvidos existe elevada cobertura populacional com as campanhas para prevenção e tratamento da doença, bem como fácil acesso ao tratamento. Isto gera a detecção precoce e conseqüentemente o estabelecimento de tratamento curativo efetivo, que leva a diminuição na incidência deste câncer [5,6].

O carcinoma cervical é a principal causa de morte por câncer entre mulheres que vivem em países em vias de desenvolvimento, sendo estimado em torno de 273.000 óbitos em todo o mundo, sendo 85% deles em países menos desenvolvidos, incluindo os da América do Sul [3]. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer cervical são também elevadas, em torno de 8.275 casos anuais, que correspondem a 38,7% de óbitos por este tipo de câncer na América do Sul [1]. Assim, é considerado um grave problema de Saúde Pública, principalmente por acometer mulheres consideradas jovens e produtivas, o que gera um grande impacto familiar e social para o país.

A citologia oncótica cérvico-vaginal ou exame de Papanicolaou (Pap) detecta as lesões pré-cancerosas e cancerosas cervicais, sendo o método de escolha para triagem deste tipo de câncer. Este exame é responsável pela redução de 80% das taxas de incidência e morte nos países desenvolvidos [7]. No Brasil, embora tenha ocorrido atualmente um aumento ao acesso para realização do exame de Pap, existem ainda muitos fatores que contribuem para as

elevadas taxas, mas três aspectos podem ajudar a compreender melhor o problema e merecem destaque: as coberturas do exame Pap, seu desempenho e o estadiamento avançado em que os casos são diagnosticados. As coberturas populacionais ainda são muito inferiores à cobertura mínima necessária recomendada pela OMS para que haja impacto nos indicadores de morbimortalidade, que é de 80% das mulheres de 35 a 59 anos de idade. Esse é certamente um dos principais fatores que contribui para a manutenção das elevadas taxas de câncer cervical no país [3]. Outro fator importante que contribui para os altos índices de morte é que o diagnóstico em várias regiões brasileiras ainda é realizado apenas no estágio avançado da doença [8].

### **LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E CARCINOMA CERVICAL**

O carcinoma escamoso cervical é uma doença de evolução lenta, que apresenta estágios precursores conhecidos como displasias ou neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Segundo o Sistema Bethesda para Diagnóstico Citológico (2001) [8], estas alterações são classificadas em: atipias em células escamosas (ASC) de significado indeterminado (ASC-US) ou não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H), atipias em células glandulares (AGC), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Este sistema foi desenvolvido para promover uma comunicação eficaz entre ginecologista e citopatologista em relação aos achados citológicos relevantes nas amostras cervicais [8,9].

A história natural das lesões pré-cancerosas apresenta grande variabilidade individual. Porém, já está bem estabelecido que a progressão do carcinoma cervical ocorre a partir das LSIL para HSIL, evoluindo para o carcinoma *in situ* e, finalmente, para carcinoma invasivo [10]. Cerca de 90% dos casos de carcinoma cervical invasor evolui a partir da HSIL, mas nem toda alteração pré-neoplásica progride para um processo invasor [1]. Cerca de 70% das LSIL regridem espontaneamente sem tratamento. A estimativa é que de 15 a 17% das LSIL infectadas com HPV 16 evoluam para HSIL [11,12].

Diversos critérios são utilizados para a avaliação do grau das alterações citológicas, entre elas o aumento da relação núcleo/citoplasma, alteração do formato nuclear e arquitetura da cromatina. Apesar da alta especificidade, o exame citológico apresenta sensibilidade limitada, uma vez que o carcinoma cervical e suas lesões precursoras constituem uma patologia complexa, com múltiplos determinantes genéticos [13]. Em decorrência disto, o exame de Pap é considerado de triagem para o câncer cervical e não um método de diagnóstico conclusivo [7].

## ***Papillomavirus* Humano (HPV) E A CARCINOGENESE CERVICAL**

O carcinoma cervical está associado ao *Papillomavirus* Humano (HPV), um membro da família *Papillomaviridae*, que são vírus epiteliotrópicos, com tropismo por células epiteliais e mucosas, capazes de induzir a alterações no ciclo celular destas células. A infecção pelo HPV, transmitida sexualmente, é considerada o principal fator na gênese do câncer cervical, associado a 99,7% dos casos de carcinomas invasivos [14,15,16,17].

O HPV infecta células epiteliais imaturas da junção escamo-colunar (JEC) do colo uterino, sendo considerada uma infecção viral frequentemente transitória, uma vez que os indivíduos desenvolvem um tipo de resposta imune específica, o que faz a infecção regredir [18]. Aproximadamente 1% da população apresenta verrugas genitais (estágio clínico da infecção) e 4% das mulheres desenvolvem lesões precursoras como LSIL ou HSIL [19].

Cerca de 1% das mulheres infectadas por um dos vários tipos virais oncogênicos apresenta risco para desenvolvimento de câncer. Lesões precursoras induzidas pelo HPV se desenvolvem aproximadamente uma década após a infecção inicial, permitindo seu reconhecimento através de recursos diagnósticos e tratamento prévio à transformação neoplásica [20]. A maior prevalência da infecção é observada nas mulheres em torno de 25 anos, havendo diminuição na faixa dos 45 a 50 anos e em algumas populações ocorre uma elevação da prevalência no período da menopausa. Sendo assim, o acometimento ocorre principalmente em mulheres sexualmente ativas, geralmente nos anos seguintes à primeira relação sexual [21].

Em torno de 200 subtipos do vírus já foram identificados e 40 infectam o sistema genital feminino. A classificação do HPV depende da sua habilidade em causar progressão maligna nas lesões que eles causam [22,23,24]. Alguns tipos de HPV, entre eles: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81, são considerados de baixo risco por causarem lesões condilomatosas e verrugas genitais, em áreas da vagina, cérvix uterina, vulva, pênis e reto. Outros tipos são considerados de alto risco como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, pois são capazes de promover alterações no DNA das células infectadas e levar à progressão maligna [25,26,27]. Nos Estados estudados no Brasil, o genótipo 16 é o mais comum, seguido do genótipo 18, semelhante ao que ocorre mundialmente [22,23,28].

Os HPVs possuem DNA de cadeia circular composto por 8.000 pares de bases (pb) e sua região tardia (L1 e L2) é capaz de codificar proteínas importantes do capsídeo, enquanto que a região precoce codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, necessárias para a replicação e manutenção da partícula viral em células infectadas. Na organização do genoma,



o gene L1 possui a sequência de nucleotídeos mais conservada, sendo base para classificação taxonômica dos HPV e utilizada como principal molde para iniciadores moleculares [29].

As proteínas E1 e E2 exercem funções de manutenção episomal do DNA viral, porém E1 exerce também uma regulação positiva da replicação genômica, enquanto que E2 funciona como repressora de E6 e E7. Estas últimas representam o potencial oncogênico dos HPV de alto risco, uma vez que inibem a função supressora de tumor da proteína p53 e retinoblastoma (pRb), que são genes supressores do ciclo celular [29,30].

Quando o vírus integra seu DNA ao cromossomo da célula hospedeira, ocorre a interrupção do gene E2. A falta deste gene leva a superexpressão de E6 e E7, levando a interrupção do ciclo celular [29,31]. A integração viral é um evento precoce no curso natural da infecção viral. Estudos têm demonstrado que amostras citológicas normais apresentaram integração de HPV de alto risco. O estado físico (forma episomal ou forma integrada) do HPV está relacionado com o grau da lesão intraepitelial, portanto, quanto mais progride a lesão menos o HPV estará na forma episomal e mais na forma integrada, principalmente o HPV 16. Por fim, a proteína E4 atua na produção de L2 e no rompimento dos filamentos de citoqueratina da célula hospedeira, ao passo que E5 altera os fatores de crescimento da mesma [32].

A transformação de uma lesão pré-cancerosa em um carcinoma invasivo de cérvix uterina está acompanhada inicialmente por uma interrupção tecidual focal seguida pela degradação da membrana basal pela ação de proteases, sendo que as metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 foram descritas por estarem presentes em associação com HPV 16 em linhagens celulares de neoplasias cervicais C33A, CaSki e Siha [33].

Outro ponto observado na transformação do epitélio cervical normal até o câncer é o equilíbrio citogenético, no qual os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico das alterações pré-neoplásicas que ocorrem durante o processo de carcinogênese, e podem ser utilizados para distinguir pacientes com risco individual para progressão da lesão [13,34,35]. A instabilidade cromossômica na forma de deleção, duplicação e amplificação de várias regiões genômicas está presente em muitos tipos de cânceres, sendo comum nos de origem epitelial. Normalmente estas alterações cromossômicas desenvolvem-se nos estágios iniciais da neoplasia e podem ser vistas até a instalação da doença. Um dos principais fatores que causam estas instabilidades no câncer cervical é a desregulação dos oncogenes virais (E6 e E7), que precedem a integração viral do HPV ao genoma do hospedeiro [14,36,37]. Vários biomarcadores para o câncer de colo uterino tem sido recentemente propostos, mas encontram-se a nível de pesquisa, entre eles o P16<sup>ink4</sup> que é um inibidor dependente de

ciclinas comumente detectado em lesões cervicais [13,16]. Dentre as anormalidades cromossômicas, já foram descritas que inserções no braço longo do cromossomo 3 estão associados a progressão da lesão cervical e alterações na sequência da região 3q26 contribuem para uma vantagem de crescimento das células infectadas pelo HPV [37]. Outros biomarcadores cromossômicos estudados na carcinogênese cervical são a deleção na região 8p e a ampliação da região 8q [38]

## **DIAGNÓSTICO DO HPV**

A análise citopatológica pelo método de Pap é considerada referência na triagem populacional do HPV, de lesões precursoras e cancerosas cervicais. Isto porque existe a possibilidade de detectar através deste exame alterações morfológicas, tanto epiteliais quanto celulares, após a infecção da camada escamosa basal pelo HPV e sua consequente replicação nestas células. Uma limitação da metodologia de Pap é a possibilidade de detectar somente alterações morfológicas resultantes da replicação do HPV, presente nas lesões clínicas e subclínicas da infecção. Nos casos de latência viral, não há manifestações cito-morfológicas e consequentemente o HPV não é detectado [39].

As técnicas moleculares para diagnóstico do HPV possuem vantagens por serem capazes de detectar o HPV também no seu estado latente. Estas técnicas auxiliam no prognóstico das pacientes e no seu acompanhamento pós-tratamento [40]. Além disto, a associação dos resultados dos exames de Pap com a positividade e genotipagem do HPV em muito contribuem para o conhecimento das características epidemiológicas e da patogênese da doença em relação à população estudada. Dentre os métodos moleculares destaca-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que em decorrência da amplificação do DNA, possui grande sensibilidade e especificidade, inclusive para quantidades muito pequenas de DNA viral [39].

Com uma variação da técnica de PCR, a PCR-RFLP (polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição), os genótipos podem também ser facilmente determinados [41]. Como um exemplo da utilização da técnica de PCR- RFLP para a genotipagem de HPV, destaca-se a descrita por Santiago et al. [42], que utiliza apenas uma enzima de restrição (HpyCH4V), com a qual é possível genotipar 40 genótipos de HPV, dentre eles de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), risco indeterminado (26, 53 e 66) e baixo risco (6, 11, 30, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 72, 74, 81, 83, 84 e 91).

## **JUSTIFICATIVA**

Até o momento, a utilização dos testes de integração viral em programas de rastreio do câncer cervical ou no manejo de pacientes com resultados citológicos anormais permanece obscuro. Embora a maioria das mulheres em algum momento da sua vida foram infectadas com HPV de alto risco, uma pequena parcela irá progredir para o câncer cervical. Portanto, há necessidade da identificação de fatores que modulam o risco de progressão da doença, e os testes de detecção e genotipagem de HPV e também de integração viral podem servir como biomarcadores preditivos.

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Determinar a distribuição de genótipos do HPV e a interrupção do gene E2 dos HPV16/18 para avaliar se a integração viral total está correlacionada com o grau de anormalidades cervicais em mulheres do Sul do Brasil.

### **ESPECÍFICOS**

Determinar através da técnica de PCR a distribuição de genótipos do HPV em mulheres sul brasileiras com anormalidades cervicais;

Avaliar através da técnica de PCR a interrupção do gene E2 dos HPV16/18 para determinar se a integração viral total está correlacionada com o grau de anormalidades cervicais.

## **Referências Bibliográficas**

- [1] INCA-National Institute of the Cancer/Brazil. Estimation of cancer in Brazil in 2010. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>. Accessed in april 03, 2011.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *Ca Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- [3] Thuler LCS. Mortality from cervical cancer in Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30(3): 216-18

- [4] Ottinger M, Smith JÁ, Schweiger MR, Robbins D, Powell MLC, You J, Howley PM. Cell type specific transcriptional activities among different papillomavirus long control regions and their regulation by E2. *Virology* 2009; 395(2): 161-71
- [5] Cesar J, Horta BL, Gomes G, Houlthausen RS, Willrich RM, Kaercher A. Factors associated with non-participation in screening for cervical cancer in Southern Brazil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(5): 1365-72.
- [6] Health Organization/Information Centre on HPV and Cervical Cancer: cervical cancer screening in developing countries 2010. Accessed in April 03, 2011.
- [7] Brazil-Brazilian Ministry of Health. Nomenclature for cervical reports and approaches recommended: recommendations for health professionals. *Rev Bras Cancerol* 2006; 52(3): 213-36.
- [8] Solomon D, Nayar R. Bethesda System for cervicovaginal cytology: definitions, criteria and explanatory notes. Second Edition. Rio de Janeiro, Brazil: Revinter, 2005.
- [9] Sebastião APM, Noronha L, Scheffel LH, Garcia MJ, Carvalho NS, Collaço LM, Bleggi-Torres LF. Study of undetermined atypias in relation to prevalence and disagreement percentile in cases of the cervical cancer screening program of Paraná, Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40(6): 431-38.
- [10] Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2000; 43:352-62.
- [11] Cantor SB, Atkinson EN, Cardenas-Turanzas M, Benedet JL, Follen M, MacAulay C. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Acta Cytol* 2005; 49: 405-15.
- [12] Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-years absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(14):1066-71.
- [13] Termini L, Villa LL. Biomarkers in cervical cancer screening. *J Bras Doenças Sex Transm* 2008; 20(2):125-31.
- [14] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JÁ, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
- [15] Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002; 3: 11-16.

- [16] Godoy AEG, Mandelli J, Oliveira FH, Calegari S, Moura LB, Serafini EP. P16<sup>ink4</sup> Expression in Precursor Lesions of Squamous Cell Cervical Cancer Related to the Presence of HPV – DNA. *Braz. J Med Biol Res* 2008;41:583-88.
- [17] Wang X, Wang H, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, Meyers C, et al. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. *RNA* 2009;15:1-11.
- [18] Cohen J. High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine. *Science* 2005;308:618-21.
- [19] Joste N. Overview of the cytology laboratory: specimen processing through diagnosis. *Obst Gynecol Clin North America* 2008;35:549-63.
- [20] Bibbo M. *Comprehensive cytology*. Chicago: WB Saunders; 1997.
- [21] Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MGF, Fernandes TAAM, Azevedo PRM, Vila LL. Prevalence of HPB infection by cervical cytologic status in Brazi. *Int J Gynecol Obstet* 2009; 105: 21-24.
- [22] Longworth M, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004; 68: 362-72.
- [23] Trottier H, Franco EL. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *Am J Man Care* 2006; 12: 462-72
- [24] Spangle JM, Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein activates mTORC1 signaling and increases protein synthesis. *J Virol* 2010;84:9398-9407.
- [25] Hong D, Chen H, Lu W, Cheg Q, Hu Y, Xie X. Distribution of human papillomavirus genotypes in the patients with cervical carcinoma and its precursors in Zhejiang Province, China. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18: 104-09.
- [26] Muñoz N, Castellsagué X, González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vacc* 2006; 24: S3-S10.
- [27] Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol* 2007;30: 813-23.
- [28] Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, rodrigues LF, Fernandes PA. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 2007; 49: 297-01.
- [29] Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39: 154-66.

- [30] Passos MR, Almeida G, Giraldo PC, Cavalcanti SMB, Côrtes JCJ, Bravo RS, et al. Papillomaviruses human in genital tract, parte I. *J Bras Doenças Sex Transm* 2008; 20: 108-24.
- [31] Fertey J, Ammermann I, Winkler M, Stöger R, Iftner T, Stubenrauch F. Interaction of the papillomavirus E8/E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression. *J Virol* 2010; 84: 9505-15.
- [32] Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV 16) DNA load and physical state for identification of HPV 16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3678-85.
- [33] da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TC, Winnischofer SM, Nakano F, Boccardo E, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cekk Biol* 2006; 84: 713-19.
- [34] Rivoire WA, Cortela HVE, Brum IS, Capp E. Molecular biology of cervical cancer. *Rev Bras Saude Matern Infant* 2006; 6: 447-51.
- [35] Arnouk H, Merkley MA, Podolky RH, Stöppler H, Santos C, Álvarez M, et al. Characterization of molecular markers indicative of cervical cancer progression. *Proteom Clin Appl* 2009; 3: 516-27.
- [36] Polocht FA, Song M, Sitailo S, O'Hare A, Ashfaq R, Morrison CLE, King W, Sokolova IA. Analysis of genetic copy number changes in cervical disease progression. *BMC Cancer* 2010; 10: 432.
- [37] Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109: 157-62.
- [38] Harris CP, Lu XY, Narayan G, Singh B, Murty VV, Rao PH. Comprehensive molecular cytogenetic characterization of cervical cancer cell lines. *Gen Chrom Cancer* 2003; 36: 233-41.
- [39] Yamamoto LSU, Alves VAF, Maeda MYS, Longato-Filho A, Utagawa ML, Eluf Neto J. A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to papillomavirus infection. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 2004; 46: 189-93.
- [40] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Reviews* 2003; 16: 1-17.
- [41] Deluca GD, Lucero RH, Martin de Civetta MT, Vicente L, de Gorodner OL, Schelover E, Alonso JM. Human papillomavirus genotypes in women with cervical cytological

abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2004;46:189-93.

[42] Santiago E, Camacho L, Junquera ML, Vázquez F. Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J. Clin Virol* 2006; 37: 38-46.

## **CAPÍTULO II**

**Artigo: “DISTRIBUTION OF HPV GENOTYPES AND INTEGRATION OF HPV  
16/18 IN WOMEN OF REGION SOUTH OF THE PARANÁ/BRAZIL WITH  
CERVICAL ABNORMALITIES.”**



**Distribution of HPV genotypes and integration of HPV 16 / 18 in women of south of the Paraná/Brazil with cervical abnormalities**

Paula R. B. Nogara<sup>a</sup>, Fabrícia Gimenes<sup>a</sup>, Marcia E. L. Consolaro<sup>a\*</sup>

*<sup>a</sup> Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Paraná, Brazil*

\*Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil. Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná/Brazil. Fax: +55 44 3011 3261.

*E- mail adres: [melconsolaro@gmail.com](mailto:melconsolaro@gmail.com) (M. E. L. Consolaro)*

*Keywords:* DNA integration, Genotypes, HPV, cervical abnormalities

The identification of high-risk (HR) human *Papillomavirus* (HPV) types offers the possibility of improving the efficiency of cervical screening programs. Although most women will at some time have been infected with HR-HPV types, very few will progress to invasive disease. Therefore, there is a continuing need for the identification of factors that modulate the risk of disease progression, and which might serve as predictive biomarkers [1].

Viral integration of HR-HPV into the host cell genome often disrupts the E1 and/or E2 region and results in the up-regulation of the viral E6 and E7 oncogenes, which might promote the development of neoplasia [2]. To date, the role that integration testing play in cervical screening programs or in managing patients with abnormal cervical cytological results remains unclear. In the present study, we used PCR methodology to determine the distribution of HPV genotypes and HPV16/18 E2 disruption to assess whether viral pure integration is correlated with the degree of cervical abnormalities in South Brazilian women.

Between November 2009 and August 2011, cervical samples were collected in the colposcopy clinic at the União da Vitória city, south/Brazil and classified according to their previous cytology findings, HSIL and IC that is confirmed by histopathology. Genomic DNA was extracted by DNAzol solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the HPV-PCR was carried out using MY09/MY11 primers [3] and the genotyping by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the enzyme *Hpy*CH4V [4]. For integration test, was also used PCR method with E2 type-specific primer for HR-HPV-16 and -18 [5]. The absence of the E2 gene amplification was considered to be a sign of E2 region disruption and pure viral integration. Written consent was obtained from all study subjects, and the research was approved by the Committee for Ethics in Research Involving Humans at the State University of Maringá/Brazil.

The mean age of the 137 women studied was  $33.60 \pm 30.72$  years (range 16-78 years), and those with invasive carcinoma (IC) were older ( $p < 0.05$ ). The prevalence of total DNA-

HPV, HR-HPV and multiple infections in all women was 56.2%, 38.7% and 12.4%, respectively and were higher detected in those with HSIL and IC ( $p < 0.05$ ). The most common HPV detected was HPV-16 (17.5%;  $p < 0.05$ ), in agreement with other studies in other regions of the world [1,6]. The most common HR-HPV, HPV-16, -51 and -45 were more detected in HSIL and IC, whereas HPV-18 and -82 only in IC ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

The low-risk (LR)-HPV was detected in 29.2%, being HPV-72 the most common (15.3%) and HPV-6 and -11 were not detected. For multiple infections, the most common occurred between HPV-72 and 16 (64.7% the all co-infections and 8.0% of the women) and up to three genotypes were detected in a single women.

The overall HPV-18 E2 gene disruption was 100.0% and this infection was evenly distributed in ASC-H, LSIL, HSIL and IC (0.7% each). For HPV-16 E2 gene, the overall disruption was 54.2%, and occurred in 50.0% in ASC, 66.7% in LSIL, 53.8% in HSIL and 50% in IC ( $p > 0.05$ ; Fig. 1). The DNA-HPV can be found in cervical cells in episomal, integrated or mixed forms (integrated plus episomal DNA). Although the PCR method used is quick and easy to perform, so that can be applied in laboratories as a biomarker of viral integration, it not able to recognize mixed forms, only pure integrated form [2]. Considering the similar results for pure integration of HPV-16 among different degrees of cytological abnormalities since ASC to IC, the use of this technique does not seem to be applicable to distinguish women with greater propensity for progression of the lesions.

## **Synopsis**

The number of infected women with HR-HPV was high, especially HPV 16. The PCR techniques to integration showed that HPV 18 integrated 100% since the initial lesions.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e Ministério da Saúde do Brasil, project EFP 00002873-SISCT.

## **Conflict of interest**

The authors have no conflicts of interest.

## **References**

- [1] Collins SI, Constandinou-Williams C, Wen K, Young LS, Roberts S, Murray PG, Woodman CB. Disruption of the E2 gene is a common and early event in the natural history of cervical human papillomavirus infection: a longitudinal cohort study. *Cancer Res* 2009;69(9):3828-32.
- [2] Cricca M, Venturoli S, Leo E, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods* 2009;158(1-2):180-83.
- [3] Manos MM, Waldman J, Zhang TY, Greer CE, Eichinger G, Schiffman MH, Wheeler CM: Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect Dis* 1994;170:1096-99.
- [4] Santiago E, Camacho L, Junquera ML, Vázquez F. Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J Clin Virol* 2006;37(1):38-46.
- [5] do Horto dos Santos Oliveira L, Rodrigues Ede V, de Salles Lopes AP, Fernandez Ade P, Cavalcanti SM. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *São Paulo Med J* 2003;121(2):67-71.

- [6] Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, Mekki Y. Human papillomavirus genotype distribution among French women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011;114(2):116-19.

**Table 1** Distribution of HPV genotypes according to cytologic findings.

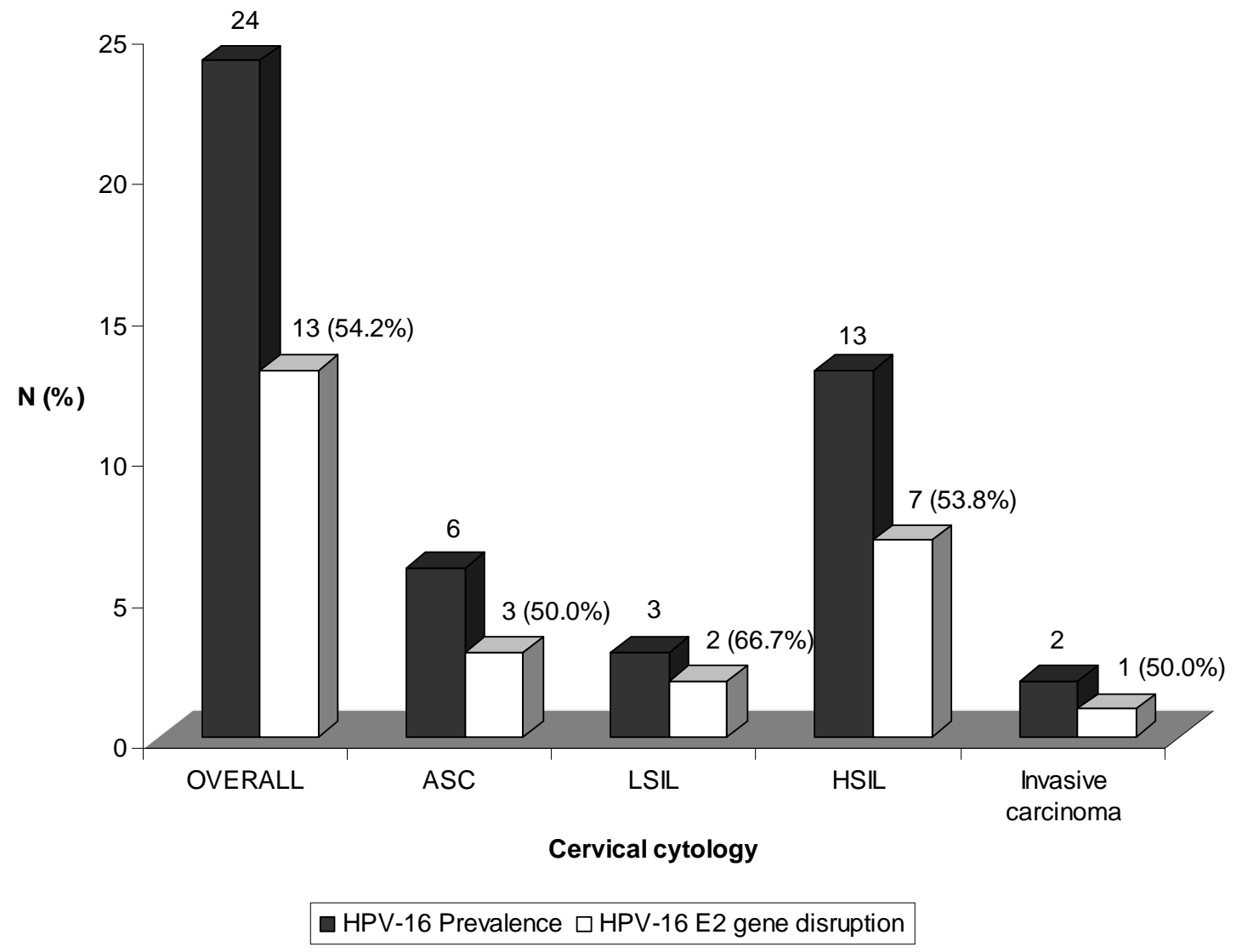
Variable	Overall	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	Invasive carcinoma	<sup>a</sup> p value
Number of patients	137	47	16	34	34	06	
<sup>b</sup> Mean age	33.60±30.72	31.25±10.65	35.06±14.56	34.75±12.99	36.56±16.02	48.83±8.70	0.0002
HPV-DNA + %	56.2	29.8	50.0	47.0	97.1	100.0	0.0215
HPV-HR %	38.7	10.6	31.2	20.6	88.2	100.0	0.0325
HPV-Multiple infection	12.4	8.5	6.2	2.9	26.5	33.3	0.0457
HPV-16 prevalence %	17.5	12.5	12.5	8.8	38.2	33.3	0.0258
HPV-18 prevalence %	2.9	-	7.2	2.9	2.9	16.7	0.1121
HPV-51 prevalence %	5.1	-	7.2	-	14.7	16.7	0.0938
HPV-82 prevalence %	3.6	-	7.2	5.9	2.9	16.7	0.0819
HPV-45 prevalence %	2.9	-	-	-	8.8	16.7	0.2041

Abbreviations: HPV, human papillomavirus; HPV-DNA +, positive HPV-DNA; HR-HPV, high risk HPV; \*Cytologic findings (according to Bethesda System 2001): atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US); atypical squamous cells of undetermined significance, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H); low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL); Invasive carcinoma, squamous cell carcinoma.

<sup>a</sup>Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) and the statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup>Mean age: mean  $\pm$  SD.

%: calculated in total 137 women.





**Fig. 1.** HPV-16 prevalence (N) and E2 gene total disruption (N/%) in different grades of cytological cervical abnormalities ( $p > 0.05$ ). The absence of the E2 gene amplification was considered to be a sign of E2 region disruption and pure viral integration.

Abbreviations: HPV, human *Papillomavirus*; Cytologic findings (according to Bethesda System 2001): ASC, atypical squamous cell of undetermined significance; LSIL, low grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high grade squamous intraepithelial lesion; Invasive carcinoma, squamous cell carcinoma.

## CAPÍTULO III

### CONCLUSÕES

O estudo realizado com 137 mulheres com anormalidades cervicais da região Sul do Estado do Paraná demonstrou que:

- 1) O número de pacientes infectadas com HPV de alto risco foi elevado, principalmente pelo HPV 16. Os HPVs 6 e 11, considerados os de baixo risco mais prevalentes na população mundial, não foram detectados na população estudada. A co-infecção mais prevalente observada foi entre os HPV 16 (alto risco) e 72 (baixo risco). No entanto, mais estudos epidemiológicos em mulheres com anormalidades citológicas devem ser realizados em diferentes regiões do nosso país, a fim de se avaliar a real frequência da infecção por HPV e distribuição genotípica.
- 2) A prevalência de HPV de alto risco foi significativamente maior em pacientes com lesões de alto grau e carcinomas, e os HPV de baixo risco detectados nestes grupos estavam em co-infecção com HPV de alto risco.
- 3) A média de idade foi significativamente maior nas pacientes com Carcinoma Cervical, quando comparado com os outros grupos de anormalidades citológicas.
- 4) Considerando os resultados semelhantes para a integração total do HPV-16 entre os diferentes graus de anormalidades citológicas, desde ASC até Carcinomas, o uso da PCR não parece ser aplicável para distinguir as mulheres com maior propensão para a progressão das lesões.
- 5) A interrupção total do gene E2 do HPV 18 foi de 100% e esta infecção foi distribuída uniformemente em ASC-H, LSIL, HSIL e Carcinomas. A técnica de PCR para a integração mostrou apenas resultados satisfatórios para o HPV-18.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Diante dos resultados obtidos, torna-se importante realizar estudos de seguimento das pacientes, principalmente daquelas cuja integração viral total de E2 foi verificada, para avaliação da progressão da lesão através de exames citológicos e/ou histológicos e verificar a persistência da infecção dos HPV de alto risco nestas pacientes.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, pretende-se iniciar também o estudo de biomarcadores de infecção pelo HPV, através de técnicas de Hibridização *in situ* pela fluorescência (FISH), objetivando correlacionar os resultados obtidos neste estudo com anormalidades cromossômicas das mulheres. Outras técnicas para o estudo da interrupção tecidual focal seguida pela degradação da membrana basal serão também realizados para avaliar o risco de progressão das lesões de alto grau para carcinomas invasores, através do estudo das proteases, como a Metaloproteinase 9 (MMP-9).

Análises adicionais de correlação dos HPV com HLA classe I e II também serão avaliados.

**ANEXOS**

## Guide for Authors

**Statement of purpose** Since its inception, the *International Journal of Gynecology & Obstetrics* (IJGO) has had two primary purposes:

- (1) to serve an international audience by publishing original scientific articles and communications originating in low-income countries which emphasize important obstetric and gynecologic problems, issues, and perspectives, such as maternal mortality and family planning; as well as publishing original articles and communications from the scientific community of high-income countries, with particular emphasis on sharing advances in the specialty of obstetrics and gynecology; and
- (2) to further the organizational purposes of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) by providing a means of bringing to the readership decisions of the officers and executive board, reports of the standing committees of FIGO, and information from the FIGO Secretariat in the intervals between meetings of the executive board and the international congresses; and by providing information from the World Health Organization and those other important international organizations that deal with women's health and the specialty of obstetrics and gynecology.

**Conflict of interest.** All authors must sign the Author(s) Guarantee Form (available online at submission) and include a statement in the cover letter and before the reference section in the article itself to declare any conflicts of interest. The author(s) must guarantee: **(1) that the article has not been published elsewhere; (2) it is not being considered for publication elsewhere; and (3) that it has been submitted with the full knowledge and approval of the institution or organization given as the affiliation of the author(s).** Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors.

**Submission.** Authors must submit manuscripts online using the Elsevier Editorial Submission System (EES): [ees.elsevier.com/ijg](https://ees.elsevier.com/ijg). Hard copy submissions will not be considered or returned. Once submitted, manuscripts undergo initial screening by the editorial staff and editors. To ensure timely processing of the high number of submissions received, papers that do not meet the journal's requirements will be declined at this stage, without peer review, and the authors will receive prompt notification. All other papers will be peer reviewed.

Authors must register using EES when submitting a manuscript, at which time they will be given a login and password for access to their Home Page (please remember this information and avoid creating duplicate accounts). Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review process using EES. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage.

### **Changes to Authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

**Guidelines for types of articles Randomized Controlled Trials (RCTs).** Submission of RCTs must include reference to ethics approval (or explanation of why ethics approval was not received). Authors must consult CONSORT checklist guidelines (⇒ <http://www.consort-statement.org/consort-statement>) and include a flow chart as a Figure with the manuscript.

**Clinical trial registration:** Authors are strongly encouraged to register clinical trials in free, public clinical trial registries. As a condition of consideration for publication, this requirement

will be compulsory for all RCTs submitted after **January 1, 2012**. The clinical trial registration should be included at the end of the abstract.

**Systematic reviews** based on the following recommended guidelines and checklists will be given preference. Systematic reviews should follow the PRISMA guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines. Further information can be obtained from the EQUATOR web site: <http://www.equator-network.org/resource-centre/library-of-health-research-reporting/reporting-guidelines>

**Useful resource** The EQUATOR Network website (<http://www.equator-network.org/home>) explains what reporting guidelines are and why they are needed. It contains links to the checklists described above and provides useful guidance for authors and editors.

**Layout of manuscripts Full-length clinical articles** should not exceed **2500 words** in the body of text, excluding the title page, abstract (no more than 200 words), synopsis, keywords, figure legends, tables and figures, acknowledgments, and references (no more than 25). Please include the word count in the cover letter and on the title page of the manuscript. Subject matter should be organized under suitable headings such as **Structured Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and References**. Footnotes should be avoided and their contents incorporated into the text. **The first page should contain:** (a) title; (b) full name(s) of author(s); (c) affiliation(s) of author(s) (i.e. department, section or unit of an institution, hospital or organization, city, state and/or country where it is located (please note street numbers and name are not required); (d) full contact details of the corresponding author; (e) a list of 3-6 keywords for indexing and retrieval; (f) synopsis no longer than 25 words, stating in one or two sentences the conclusions of the paper. The reference list should not exceed 25 references. Papers are published in English, using American spelling. The editors reserve the right to make any necessary editorial changes. Clinical research should include a statement that the study has been approved by the Institutional Review Board or other appropriate body.

**Systematic review articles** should adhere to QUOROM or MOOSE guidelines, with no more than 3000-3500 words and 40 references. A structured abstract of no more than 200 words is

required and should include the following sections: **Background; Objectives; Search Strategy; Selection criteria; Data collection and analysis; Main results; Conclusions.**

**Brief communications** (including case reports) should be no more than 400 words in the body of text, excluding synopsis, keywords, figure legends, tables and figures, and references. There should be no more than 4 references, no more than 1 table or 1 figure, and no more than 3 authors.

**Submission requirements** The names of all authors should be listed on the Author(s) Guarantee Form, which is available at submission. There should also be a transmittal letter. After the article has been accepted for publication, the name of each author must also be listed on a Transfer of Copyright assigning the International Federation of Gynecology and Obstetrics all rights to the manuscript to protect the author(s) and the IJGO from unauthorized use of the article's contents. The article's principal author is responsible for ensuring that all the necessary forms are completed.

**Uniform requirements.** The requirements of the *International Journal of Gynecology & Obstetrics* are in accordance with the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*: <http://www.icmje.org/>.

**Abstracts.** A **structured abstract** is required for all regular clinical articles. The structured abstract, limited to 200 words, should contain all and only the following major headings: **Objective; Methods; Results** and **Conclusion**. The clinical trials registration should be included at the end of the abstract. The **Objective** reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The **Methods** should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The **Results** include the outcome of the study and statistical significance, if appropriate. The **Conclusion** states the significance of the results. A **structured abstract** not exceeding 200 words is required for systematic review articles (Background; Objectives; Search Strategy; Selection criteria; Data collection and analysis; Main results; Conclusions).

**Synopsis.** The author should provide a one- or two-sentence synopsis, no longer than 25 words, of the conclusions of the paper for use in the table of contents. No acronyms or abbreviations may be included in the synopsis; these must be spelled out.



**Acknowledgements.** No personal acknowledgements are allowed. Only funding organizations may be acknowledged.

**Conflict of interest.** Authors should disclose any conflicts of interest, as described in the Author Guarantee Form, in a statement appearing before the references. If the authors have no conflicts to disclose then this should also be stated.

**References.** References should not exceed 25 in number and should in general be limited to the last decade. They must be numbered and listed as they are cited in the article, using Index Medicus abbreviations for journal titles. They should accord with the system used in *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*: <http://www.icmje.org/>. List all authors, but if there are more than six, list first six plus et al. Include the volume and issue numbers.

[1] Vellacott ID, Cooke EJ, James CE. Nausea and vomiting in early pregnancy. *Int J Gynecol Obstet* 1988;27(1):57-9.

[2] Speroff L, Glass BH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1982: 105.

[3] Disaia PJ, Creasman WT. Invasive cancer of the vulva In: Disaia PJ, Creasman WT, editors. *Clinical Gynecologic Oncology*. St. Louis: C.V. Mosby; 1984: 214-219.

Text references should be indicated by Arabic numerals in brackets: 'the incidence is similar to that in other reports [1,5,11,17]. Davies et al. [6] have reported ....' To avoid any delays in the editing process, authors must make every effort to see that each reference is correct and complete. Incomplete references will be returned to the principal author for completion before the manuscript is edited. All references must be in English. Citation information of those originally in other languages must be translated into English in the reference list. This journal should be cited as *Int J Gynecol Obstet*.

**Editorial style.** Arabic numerals should be used for weights, measures, percentages, and degrees of temperature. Weights and measures should be abbreviated according to the International System of Units: kg, g, mg, µg, mmol, µmol; m, cm, mm, µm, nm, A, cm<sup>2</sup>, mL, µl; M, mM, µM, nM; N; h, min, s, ms, µs. Use % after numerals throughout. Give **generic**

**names** of all pharmaceutical preparations and, where appropriate, include (in parentheses, following) the trade name and manufacturer's name and address. Give the manufacturer's name and address (in parentheses) following names of any instruments or equipment cited by brand name. Manuscripts not adhering to Instructions may be returned to author.

**Tables.** Each table should be titled, numbered (with Arabic numerals), and on a separate page. Only standard, universally understood abbreviations should be used. Authors should prepare tabular material in an easily readable form, eliminating tables presenting information that can easily be incorporated into the text. Tables should be referred to in the text as 'Table 1' etc. and approximate position indicated.

**Figures and Photographs.** All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or JPEG format. Figures and photographs of good quality should be submitted online as a separate file (no less than 300 dpi). Please use a lettering that remains clearly readable even after reduction to about 66%. For every figure or photograph a legend should be provided; legends should be typed double-spaced and numbered consecutively in the order of their citation using Arabic numerals. If you submit usable color figures, Elsevier will ensure that these figures appear free-of-charge in color in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **Color illustrations can only be included in print if the Author contributes the additional cost of reproduction:** you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications that may arise by converting color figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for color in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all color illustrations. All Authors wishing to use illustrations already published must first obtain the permission of the Author and publisher and/or copyright holders and give precise reference to the original work. This permission must include the right to publish in electronic media. Advice on the preparation of electronic artwork can be found at the following URL: [www.elsevier.com/artworkinstructions](http://www.elsevier.com/artworkinstructions).

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download

Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

### **SUBMISSION CHECKLIST**

Please check each item to be certain that the article is in compliance with the formation and requirements of the *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. The checklist is available online at submission and must be completed by the author(s) for inclusion in the record.

**TYPE OF ARTICLE:** Please specify Clinical Article, Brief Communication, Review Article.

**TITLE PAGE:** This page should contain (a) title of the paper; (b) name(s) of author(s); (c) affiliation(s) of author(s); (d) full contact details of the corresponding author; (e) 3-6 keywords; (f) synopsis.

**WORD COUNT:** Include word count on cover letter and title page of manuscript.

**NUMBER OF AUTHORS:** Do not list more than six authors.

**STRUCTURED ABSTRACT:** The abstract should be no more than 200 words in length for clinical articles and systematic reviews.

**SYNOPSIS:** Provide a one- or two-sentence synopsis no longer than 25 words of the conclusions of the paper for the table of contents. Spell out all acronyms or abbreviations.

**DRUG NAMES AND DOSAGES:** Review drug names and dosages with care. **The author is responsible for all recommended dosages.** Use only generic names of all pharmaceutical preparations. The trade name and manufacturer's name and address may be included in parentheses following the first mention of the drug in the article.

**FIGURES AND TABLES:** Check that all figures, legends, and tables are submitted. Legends should be typed on a single separate page, figures and tables with Arabic numerals. Figures must be of publication quality, in black and white or color.

**REFERENCES:** Please use the IJGO format (see full Instructions to Authors). You should include no more than 25 references for clinical articles or 40 for systematic reviews, limited, in general, to the last decade, and all in English.

**NAME AND ADDRESS FOR REPRINT REQUESTS:** Use only initials, surname and mailing address. Do not include academic titles. To facilitate communication regarding this article, please provide: E-mail; Tel. no; Fax no.

**AUTHOR(S) GUARANTEE FORM:** This form should accompany the manuscript and include the full name of each author.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.