

**INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA
CENTRO DE CAPACITAÇÃO EDUCACIONAL**

STÉPHANNY SALLOMÉ SOUSA OLIVEIRA

O HPV E SUAS PRINCIPAIS FORMAS DE DIAGNÓSTICO

**RECIFE
2016**

STÉPHANNY SALLOMÉ SOUSA OLIVEIRA

O HPV E SUAS PRINCIPAIS FORMAS DE DIAGNÓSTICO

Monografia apresentada ao Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa e Centro de Capacitação Educacional, como exigência do curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Citologia Clínica.

Orientador: Dr. Gustavo Santiago Dimech

Co-orientadora: Dr. Valeska Silva Lucena

**RECIFE
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da Faculdade Maurício de Nassau, Campina Grande – PB, Brasil)

O48h OLIVEIRA, Stéphanhy Sallomé Sousa.

O HPV e suas principais formas de diagnóstico/Stéphanhy
Sallomé Sousa Oliveira.

Recife, PE, 2016. 34 pág.

Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Citologia
Clínica. – INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA – INESP-RECIFE - PE

Orientador. Prof. Dr. Gustavo Santiago Dimech / Co-orientadora: Dr. Valeska
Silva Lucena

1. Câncer do colo do útero. 2. *Papilomavírus Humano*. 3.
Diagnóstico. 4. Biologia Molecular.

FMN

CDU:618.14-006

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é responsável por lesões no trato urogenital masculino e feminino, cujas principais formas de transmissão se dão através de relação sexual desprotegida, fômites e transmissão parenteral. O diagnóstico das lesões causadas pelo HPV é realizado através de métodos morfológicos que vão desde o exame clínico, citologia oncótica, colposcopia e histopatologia ou biópsia, porém estes métodos não permitem identificar que tipo de vírus está causando a infecção. Neste sentido, é importante a utilização de métodos mais sensíveis e específicos para a detecção do HPV. Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho é mostrar as principais formas de diagnóstico do HPV e a importância das técnicas de biologia molecular na identificação do mesmo, apresentando a biologia e a biossíntese do vírus; identificando os principais tipos de HPV e sua oncogenicidade e destacando os principais métodos diagnósticos na identificação do HPV. Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada mediante a busca eletrônica de artigos indexados em bases de dados como SCIELO, LILACS, MEDLINE/PUBMED a partir das palavras-chave relacionadas ao assunto principal: “câncer do colo do útero”, “Papilomavírus humano”, “diagnóstico”, “biologia molecular”, compreendidos no período de 2002 a 2016. Apesar da citologia oncótica convencional ser adotada como padrão ouro para rastreamento do câncer do colo do útero e suas lesões precursoras, esta técnica pode sofrer interferentes que alteram sua sensibilidade diagnóstica. Das técnicas diferenciais utilizadas para identificação do HPV destacam-se as moleculares na qual a captura híbrida e a PCR são consideradas mais importantes, sendo o primeiro método citado mais propenso a resultados falso-positivos.

Palavras-chave: Câncer do colo do útero. *Papilomavírus Humano*. Diagnóstico. Biologia molecular.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is responsible for lesions in the male and female urogenital tract, whose main forms of transmission are through unprotected sexual intercourse, interferences and parenteral transmission. Diagnosis of HPV lesions is performed using morphological methods ranging from clinical examination, oncology cytology, colposcopy and histopathology to biopsy, but these methods do not allow identification of what type of virus is causing the infection. In this sense, the use of more sensitive and specific methods for the detection of HPV is important. In this perspective, the objective of this work is to show the main forms of HPV diagnosis and the importance of molecular biology techniques in the identification of HPV, presenting the biology and biosynthesis of the virus; Identifying the main types of HPV and their oncogenicity and highlighting the main diagnostic methods in the identification of HPV. This is a bibliographical review carried out through the electronic search of articles indexed in databases such as SCIELO, LILACS, MEDLINE / PUBMED from the keywords related to the main subject: "cervical cancer", "Human papillomavirus" , "Diagnosis", "molecular biology", from 2002 to 2016. Although conventional oncology cytology is adopted as a gold standard for the screening of cervical cancer and its precursor lesions, this technique may suffer from interferences that alter its sensitivity The differential techniques used to identify HPV are the molecular ones in which the hybrid capture and the PCR are considered more important, the first method cited being more prone to false-positive results.

Key words: Cancer of the cervix. Human Papillomavirus. Diagnosis. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV	13
Figura 2. Ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV) no epitélio escamoso: o HPV pode apresentar-se na forma epissomal ou integrado ao DNA da célula hospedeira. Integrado ao DNA, o vírus impede a parada do ciclo celular da célula epitelial ocasionando dessa forma o aparecimento de lesões displásicas que podem progredir para neoplasias invasivas.....	15
Figura 3. Classificação do HPV de acordo com o local e o tipo de lesão.....	17
Figura 4. Alterações citopatológicas do HPV causadas pelos coilócitos.....	20
Figura 5. Hibridização in situ de um NIC 3; HPV 16 visível apenas em células superficiais.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HPV- Papilomavírus humano

DNA- ácido desoxirribonucléico

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR- Reação de Polimerase em Cadeia

ORF- fase de leitura aberta (*open reading frames*)

URR- região controladora

p53- proteína 53

Prb- proteína retinoblastoma

RNA- ácido ribonucleico

JEC- junção escamo colunar

CH- captura híbrida

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NIC- neoplasia intraepitelial cervical

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
1. O PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	10
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HPV E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....	10
1.2 BIOLOGIA E BIOSÍNTESE DO HPV.....	11
1.3 TIPOS DE HPV E SUA ONCOGÊNICIDADE.....	14
2. DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	17
2.1 DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL DO HPV.....	17
2.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO HPV.....	19
2.2.1 Imunohistoquímica	19
2.2.2 Testes Imunológicos	21
2.2.3 Biologia Molecular	22
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	29

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer no colo do útero é considerado um dos grandes problemas de saúde pública bastante incidente nos países subdesenvolvidos, tendo sua etiologia associada principalmente com o HPV, em aproximadamente 99,7% do casos (NOBREGA JÚNIOR; BARBOSA, 2013). No Brasil, 137 mil novos casos de infecção por HPV são registrados por ano, sendo o mesmo um dos líderes mundiais em incidência deste tipo de doença. (LUZ et al., 2015).

O câncer cervical é o segundo que mais acomete as mulheres no mundo, ficando atrás apenas do câncer de mama e sendo a quarta causa de morte entre a população feminina do Brasil. Para o ano de 2016, no Brasil, são esperados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição (INCA, 2015).

O Papilomavírus Humano (HPV) é responsável por lesões no trato urogenital masculino e feminino, cujas principais formas de transmissão se dão através de relação sexual desprotegida, fômites e transmissão parenteral (BARBOSA FILHO et al., 2010).

Entre os fatores de risco para o surgimento do câncer cervical uterino e de suas lesões precursoras, a infecção cervical por tipos oncogênicos do HPV tem sido estabelecida dentro dos critérios de causalidade (DA SILVA et al., 2006). Contudo, a infecção pelo HPV, por si só, não representa uma causa suficiente para o surgimento dessa neoplasia, sendo necessária a persistência da infecção (INCA, 2015). A associação para infecção e a prevalência do vírus estão associadas a alguns fatores de risco, como: genótipo viral, carga viral, persistência e integração do DNA viral com o genoma da célula hospedeira, início precoce de relações sexuais, multiparidade, múltiplos parceiros sexuais, o uso de contraceptivos orais, tabagismo e infecção por doenças sexualmente transmissíveis (ASSUNÇÃO; CORREIA; 2014).

O HPV é composto por DNA de dupla hélice, cada uma delas contendo cerca de 7.900 pares de base. Este vírus infecta o epitélio da pele e de certas membranas mucosas. A célula epitelial que hospeda o vírus é o queratócito ou células escamosa produtora de queratina. A replicação viral, bem como a formação de partículas virais *in vivo*, está intimamente relacionadas à maturação e diferenciação do epitélio escamoso, produzindo um efeito patogênico denominado coilocitose. Essa alteração morfológica das células é comum a todos os tipos de HPV que acometam a região anogenital, oncogênicos ou não (KOSS; GOMPEL, 2014).

A infecção pelo HPV pode ser dividida em três formas, clínica, subclínica e latente. As alterações características da forma clínica podem ser visualizadas com a presença de verrugas, os chamados condilomas acuminados. Já as alterações da forma subclínica são observadas no colo do útero através da colposcopia com a presença do condiloma aplainado sendo a forma mais frequentemente observada. Já a forma latente só é identificada pelo uso de técnicas moleculares através de métodos que detectam o DNA viral (CASTRO et al., 2009).

O diagnóstico das lesões causadas pelo HPV é realizado através de métodos morfológicos que vão desde o exame clínico, citologia oncótica, colposcopia e histopatologia ou biópsia, porém estes métodos não permitem identificar que tipo de vírus está causando a infecção (DE SÁ et al., 2016). Neste sentido, é importante a utilização de métodos mais sensíveis e específicos para a detecção do HPV. Técnicas moleculares como a hibridização utilizam sondas específicas para localizar o DNA viral nas amostras retiradas da lesão. Esta técnica possui outras variações como o *Southern blot*, Hibridização *in situ*, captura híbrida (CH), *Dot blot*, que apresentam uma boa especificidade e sensibilidade para este tipo de detecção. (ARAÚJO; REIS, 2014).

Para o diagnóstico molecular do HPV, existe também a reação em cadeia da polimerase (PCR), que tem se mostrado altamente sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos além de possibilitar a identificação de um maior número de vírus numa pequena quantidade de amostra analisada, bem como na resolução de dúvidas originadas, durante o diagnóstico citohistopatológico e o exame colposcópico, não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas também nas infecções latentes ou subclínicas associadas a esse agente viral (KENNE et al., 2014).

Este estudo trata-se de uma revisão bibliográfica realizada mediante a busca eletrônica de artigos indexados em bases de dados como SCIELO, LILACS, MEDLINE/PUBMED a partir das palavras-chave relacionadas ao assunto principal: “câncer do colo do útero”, “Papilomavírus humano”, “diagnóstico”, “biologia molecular”, compreendidos no período de 2002 a 2016.

Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho é mostrar as principais formas de diagnóstico do HPV e a importância das técnicas de biologia molecular na identificação do mesmo, apresentando a biologia e a biossíntese do vírus; identificando os principais tipos de HPV e sua oncogenicidade e destacando os principais métodos diagnósticos na identificação do HPV.

1 - O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.1 - EPIDEMIOLOGIA DO HPV E CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

A taxa de incidência do câncer do colo do útero vem diminuindo, ao longo das últimas três décadas, na maioria dos países em processo de transição socioeconômica. Tal fato reflete, principalmente, as implementações de programas de prevenção (INCA, 2015). Geralmente a doença evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Por outro lado, com exceção do câncer de pele, este é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. Estima-se que ocorra uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esse câncer, com a realização do rastreamento das lesões através do teste de papanicolaou em de mulheres, na faixa etária de 25 a 65 anos, bem como através do tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou *carcinoma in situ* (KENNE et al., 2014).

Acredita-se que a infecção masculina contribua significativamente para a infecção e subsequente doença cervical em mulheres e estima-se que mais de 70% de parceiros de mulheres com infecção cervical por HPV são portadores do DNA desse vírus. A infecção pelo HPV fora da região genital foi detectada em até 73% de homens saudáveis, sendo que a persistência desta infecção é menor do que nas mulheres, e a idade parece não influenciar na incidência e duração (SANTOS et al., 2011).

Alguns fatores socioeconômicos contribuem para a infecção por HPV e assim são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, tais como baixa renda familiar, escolaridade baixa, início da atividade sexual precoce, estado civil, fatores ambientais e os hábitos de vida (NOBREGA JÚNIOR e BARBOSA, 2013). Diante do conhecimento desses fatores, a vacina contra o HPV é uma das principais ferramentas para o combate ao câncer do colo do útero (INCA, 2015).

O Ministério da Saúde está atualmente promovendo a campanha de vacinação contra o HPV imunizando meninas de 11 a 13 anos de idade em que ainda não tiveram relação sexual, gerando proteção prévia a um contato posterior

com vírus de alto risco. Esta vacina agora faz parte do calendário de vacinação e tem como meta vacinar 80% do público alvo e para alcançar este objetivo, está disponibilizando a vacina em 36 mil postos de saúde e escolas públicas do país durante o ano inteiro (ARAUJO; REIS, 2014).

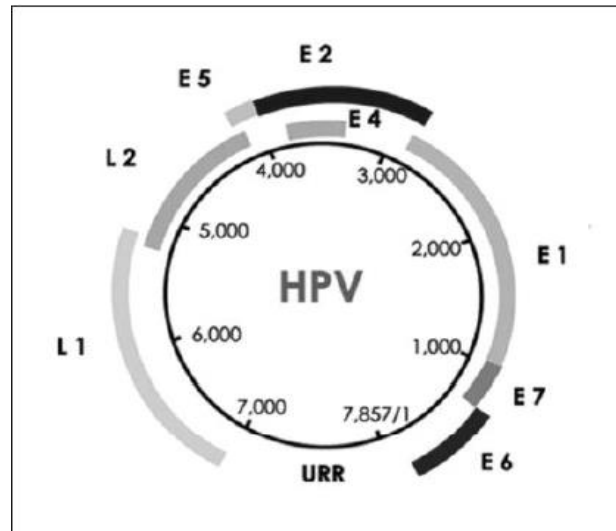
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou a indicação da vacina contra o HPV em meninos e homens de 9 a 26 anos de idade, a indicação é para prevenir verrugas genitais e lesões relacionadas aos tipos 6 e 11 do vírus. A base da aprovação da vacina para o sexo masculino foi um estudo publicado no “New England Journal of Medicine”, que comprova a redução de 90% das lesões genitais externas e também a diminuição da infecção persistente pelo HPV em 85% dos casos. O estudo foi realizado com 4.065 homens de 16 a 26 anos, em 18 países (incluindo o Brasil) e comprovou a eficácia da vacina contra os tipos 6, 11, 16 e 18 do papilomavírus (ROSENBLANT, 2012).

1.2 - BIOLOGIA E BIOSÍNTESE DO HPV

O HPV desempenha papel central na carcinogênese e, atualmente, é reconhecido como o agente causal inequívoco de condilomas, neoplasias intraepiteliais e carcinomas cervicais (BURD, 2003). Pertencente à família *Papillomaviridae*, gênero Papilomavírus. São vírus não envelopados de simetria icosaédrica, com capsídeo composto por 72 capsômeros e um genoma de DNA dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases, podendo ser encontrados em epitélios de muitos animais, incluindo aves, répteis e mamíferos, sendo espécie-específico (CAMARA et al., 2008).

O genoma do HPV possui oito regiões conhecidas como fases de leitura aberta (*Open Reading Frames*) e uma região não-codificadora. As fases de leitura aberta são organizadas em três regiões: a região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), responsáveis por processos iniciais da replicação viral, no controle de sua transcrição e na transformação celular; a região tardia (composta pelos genes L1 e L2), responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, como a síntese de proteínas estruturais do capsídeo; e uma região responsável pela modulação destes processos na célula do hospedeiro, chamada região controladora (URR) (FERRAS et al., 2012; PINTO et al., 2012). (Figura 1)

Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV.



Fonte: FERRAZ et al. (2012).

Existem atualmente mais de 200 tipos de HPV sendo que novas linhagens são descobertas e adicionadas a esta lista (VIDAL et al., 2012). Sua classificação em tipos distintos é feita a partir das diferenças entre a sequência de nucleotídeos do seu genoma viral. Diferentes tipos de HPV possuem menos de 60% de semelhança nas suas sequências de nucleotídeos que constituem a principal proteína do capsídeo, a L1 (ARAÚJO; REIS, 2014).

A importância da proteína L1 se dá a produção das vacinas contra o HPV que são preparadas a partir de partículas virais semelhantes ao vírus (VLP, do inglês *virus-like particle*), produzidas por tecnologia recombinante, oriundas da proteína L1 do capsídeo viral dos tipos de HPV, altamente purificadas e capazes de gerar resposta imunológica. Como as VLP não contêm DNA (ácido desoxirribonucléico) viral, não são capazes de infectar células, se reproduzirem ou causarem doenças (CONITEC, 2013).

A infecção do HPV na célula ocorre através de microfissuras na camada basal do epitélio. O vírus penetra na célula, migra para o núcleo e permanece na forma episossomal, ou seja, permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro, não integrado ao DNA da mesma. Após seu estabelecimento, o HPV inicia sua replicação na célula hospedeira chegando ao número de 50/100 episossomos por

célula. À medida que a célula basal se divide, os episômos do HPV também são replicados e se distribuem entre as células-filhas (Figura 2) (VIDAL, 2012).

O ciclo de vida do HPV está intimamente relacionado com o processo de diferenciação e renovação do epitélio. O epitélio escamoso normal cresce como camadas estratificadas onde apenas as células da camada basal são capazes de proliferar, enquanto as células dos estratos superiores tornam-se diferenciadas e não proliferativas. Durante a renovação do epitélio, a célula basal se divide e uma das células-filhas migra para as camadas superiores do tecido iniciando sua diferenciação e interrupção do seu ciclo proliferativo, enquanto a outra célula-filha permanece na camada basal com fenótipo proliferativo perpetuando a linhagem. Células infectadas pelo HPV perdem a capacidade de controlar o ciclo celular mesmo quando diferenciadas (VIDAL, 2012).

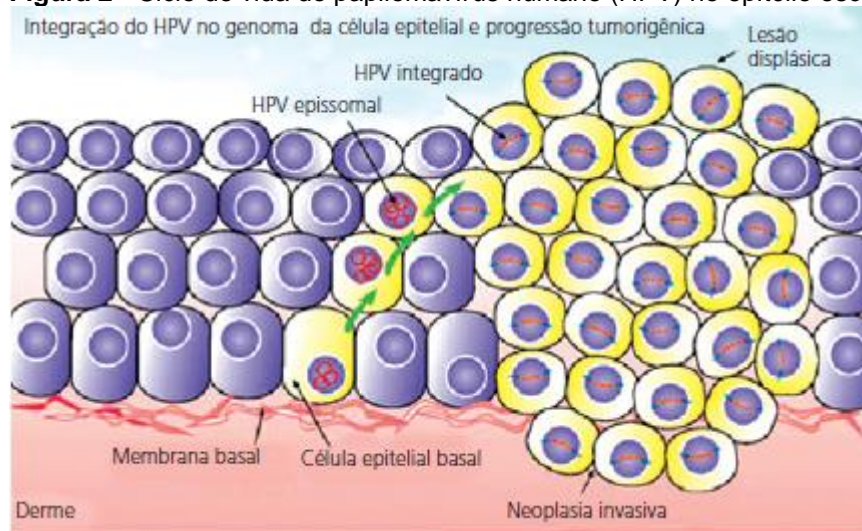
Segundo Doorbar (2005), o ciclo normal da infecção pelo HPV passa por cinco etapas consecutivas: 1) infecção, 2) manutenção do genoma, 3) fase proliferativa, 4) amplificação genômica e 5) síntese e liberação de novas partículas virais. Para a produção de partículas virais, ocorre a amplificação do genoma do HPV, que é dependente da expressão dos genes E1, E2, E4 e E5. A montagem das partículas infecciosas ocorre nas camadas médias e superiores do epitélio cervical. Nesta fase mais tardia, os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral e são expressos nos grupos de células com maior expressão do gene E4, importante na alteração da matriz intracelular, maturação e replicação do vírus. A montagem dos vírions e o empacotamento do DNA celular ocorrem na camada superficial. A formação e liberação de partículas virais completas são liberadas na superfície do epitélio sem lisar as células hospedeiras, caracterizando o ciclo produtivo da infecção pelo HPV (DOORBAR, 2005).

Esta organização da expressão viral no ciclo de uma infecção produtiva é semelhante para os diferentes tipos de HPV. Porém, o desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação deste ciclo produtivo do HPV, evento observado em infecções persistentes pelos HPVs de alto risco oncogênico, que tendem a integrar o seu genoma ao da célula hospedeira. Durante o processo de integração, o genoma viral pode perder o gene E4 e parte do gene E2, que exerce função de controle da transcrição dos demais genes virais. Em consequência da perda de função de E2, haverá um aumento da expressão dos genes E6 e E7 e

uma incapacidade do vírus dar continuidade ao seu ciclo de vida. Neste cenário, não haverá amadurecimento das células hospedeiras e produção de novas partículas virais (FERRAZ et al., 2012).

Os genes virais E6 e E7 são citados em vários estudos por serem responsáveis pelo desenvolvimento do câncer no colo uterino. A proteína codificada pelo gene E6 provoca a destruição da proteína p53, principal gene de supressão tumoral humano, que é responsável pelo processo de apoptose da célula hospedeira, ocasionando um aumento de mutações na célula infectada, e as proteínas codificadas pelo gene E7 inativa a proteína pRB (proteína do retinoblastoma) que provoca o bloqueio do ciclo normal celular. Com a junção desses eventos, a célula perde o controle de sua divisão mitótica e começa a se proliferar de forma descontrolada tendo como consequência a formação do câncer (FERRAZ et al., 2012).

Figura 2 - Ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV) no epitélio escamoso



O HPV pode apresentar-se na forma episossomal ou integrado ao DNA da célula hospedeira. Integrado ao DNA, o vírus impede a parada do ciclo celular da célula epitelial ocasionando dessa forma o aparecimento de lesões displásicas que podem progredir para neoplasias invasivas.

Fonte: Vidal et al. (2012)

1.3 - TIPOS DE HPV E SUA ONCOGÊNICIDADE

Atualmente, há mais de 200 tipos de HPV descritos, entretanto, destes, apenas metade dos tipos de HPV foram identificados, com seus genomas isolados e completamente sequenciados. Baseando-se na sequência de seus nucleotídeos,

mais de 120 tipos de HPV foram completamente sequenciados até então (MAGALHÃES et al.; 2012). Os subtipos virais correspondem a genomas cuja sequência nucleotídica nessas regiões gênicas diferir entre 2% e 10% dos tipos já descritos (SOLTO et al., 2005).

Os genótipos do HPV foram agrupados em quatro categorias exclusivas baseadas no risco de câncer cervical: (1ª) positivo para HPV16, (2ª) negativo para HPV16, mas positivo para um ou mais outros tipos de HPV de alto risco (HPV18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59 ou 68), (3ª) negativo para qualquer tipo de HPV de alto risco, mas positivo para um ou 6 mais tipos de HPV de baixo risco (HPV6, 11, 26,40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70-73, 81-84, e 39 ou 89), ou (4ª) negativo para HPV (WHEELER et al., 2013).

A classificação taxonômica baseia-se na seqüência de nucleotídeos dos HPV, claramente correlacionada com seu tropismo tissular e seu potencial oncogênico (GUIMARÃES et al. 2006). (Figura 3)

Todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Em lesões malignas associadas ao HPV 16 e 18, o DNA viral permanece integrado nos cromossomos hospedeiros. Diferente do que ocorre, por exemplo, com os DNA dos HPV 6 e 11, que permanecem separados do DNA da célula hospedeira e surge como um plasmídeo extracromossomal (RIVOIRE et al., 2001).

Figura 3 – Classificação do HPV de acordo com o local e o tipo de lesão

TIPOS DE HPV	LOCAL DE PATOLOGIA	TIPO DE LESÃO
1, 4	Palma da mão	Verrugas palmares e plantares
2	Extremidades inferiores e superiores	Verrugas comuns
3, 10	Mãos e rosto	Verrugas Planas
7	Mão	Verruga de Butcher
5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 29, 36, 38	Testa, braços e pernas	Verrugas e câncer de pele em pacientes com comprometimento imunológico e epidermodisplasias verruciforme
6, 11, 42, 43, 44	Urogenital, anal, ororrespiratório	Condilomas acuminados
16,18,,30, 31, 35, 39, 40, 41, 45, 51, 59, 61, 62, 64, 68	Urogenital, anal, ororrespiratório	Displasias e Câncer invasivo
13, 32	Cavidade bucal	Hiperplasia
30,40	Laringe	Câncer de Laringe

Fonte: DE REZENDE (2001)

2 - DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O diagnóstico da infecção por HPV leva em conta os dados da história, exame físico e exames complementares com a pesquisa direta do vírus ou indiretamente através das alterações provocadas pela infecção nas células e no tecido (DEMATHE et al., 2011). A presença do vírus HPV pode ser detectada através de vários métodos, sendo cada um dependente do estágio biológico em que se encontra a infecção (HAVRECHAK, 2002). Na forma clínica, apresentam-se lesões verrucosas evidentes, identificadas a partir de um exame clínico detalhado. Na forma subclínica pode ser detectada através de exames citológicos, colposcopia e biópsia. Na forma latente pode ser identificada através do uso de técnicas moleculares (ARAÚJO; REIS, 2014).

2.1 - DIAGNÓSTICO CONVENCIONAL DO HPV

O primeiro diagnóstico de alterações celulares associadas ao HPV é feito com ajuda a aplicação de ácido acético 4%, sobre as que se tornam esbranquiçadas e são visualizadas a olho nu com a ajuda de um colposcópio (DOS PRAZERES, 2011). A colposcopia é um exame de extremo valor para a detecção das lesões causadas pelo HPV que visa avaliar a superfície e as terminações vasculares do colo do útero, vagina e vulva. (RAMOS et al., 2009). Particularidades das lesões são analisadas, como: tonalidade e intensidade aceto-branca, contorno da margem e superfície das áreas aceto-brancas, padrão vascular e permanência do iodo. Tendo melhor eficiência em diferenciar as lesões de baixo grau das de alto grau (ALBUQUERQUE, 2016).

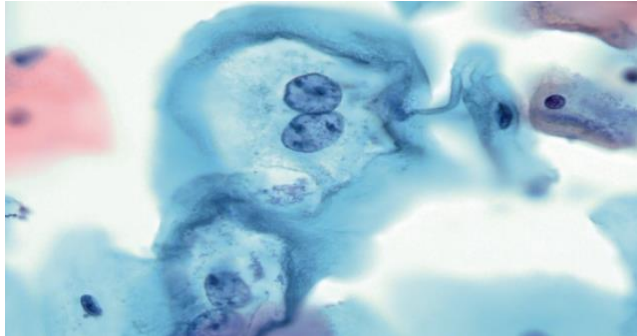
A principal manifestação do HPV pode ser confirmada pela observação microscópica, com base na sua aparência histológica na qual é feita uma análise da distribuição e arranjo das células na pele. O método histológico não identifica o HPV, ele apenas observa as alterações patológicas características da infecção por estes vírus, como hiperplasia (acantose), coilocitose (vacuolização do citoplasma), disceratose, paraceratose, atipias nucleares e outros. O resultado baseia-se na graduação das lesões cervicais, que são classificadas conforme o sistema Bethesda como NIC (Neoplasia intraepitelial cervical) I, II e III (CAVALCANTE; CARESTIATO, 2008).

A citologia oncótica convencional, exame subsequente à visualização macroscópica das lesões foi um método desenvolvido originalmente pelo médico grego George Papanicolau que tem se mostrado como o principal meio de prevenção da doença, pois permite a detecção da infecção do HPV classificando o nível de acometimento celular, permitindo o tratamento da lesão antes que a mesma alcance a junção escamo colunar (JEC) e posteriormente se instale como carcinoma (NASCIMENTO; ANDRADE, s/d). É uma técnica simples, de fácil execução e tem se mostrado eficaz e apto para aplicação em larga escala, além do baixo custo (MAGALHÃES et al., 2012). Geralmente se recomenda que as mulheres realizem o exame anualmente a partir dos 25 anos. Tendo dois resultados negativos, a periodicidade do exame passa a ser a cada três anos, conforme as diretrizes do Ministério da Saúde (GUIA DO HPV, 2013).

O principal marcador citológico da presença desse vírus é a coilocitose, termo introduzido por Koss e Durfee, que o empregaram para designar as alterações perinucleares que resultariam do metabolismo celular alterado (RAMOS et al., 2009). Essa alteração morfológica das células é comum a todos os tipos de HPV que acometem a região anogenital, oncogênico ou não (KOSS; GOMPEL, 2014). São três os aspectos mais característicos da infecção pelo HPV: halo coilocítico, presença de disqueratose e binucleação. A coilocitose é o aspecto mais clássico. Os coilócitos são células escamosas intermediárias ou superficiais que apresentam núcleos volumosos, hipercromáticos e, habitualmente, homogêneos. Os núcleos encontram-se circundados por uma zona de citoplasma claro ou halo, a qual apresenta tamanho variável, porém costuma demonstrar limites periféricos bastante nítidos. A zona perinuclear ou halo representa a necrose citoplasmática (KOSS e GOMPEL, 2014).

Uma análise da eficiência de métodos de diagnósticos para a infecção por HPV demonstrou que o uso da citologia oncótica juntamente com a colposcopia apresenta um melhor resultado para o rastreamento das lesões pré-cancerosas e cancerosas quando comparado à realização isolada da citologia oncótica. Esses métodos podem ser aplicados na rotina dos serviços de saúde, sendo necessária uma estrutura adequada para realização dos exames com profissionais capacitados para realização das análises (ARAÚJO; REIS, 2014).

Figura 4: Alterações citopatológicas do HPV causadas pelos coilócitos.



Fonte: ARAÚJO; REIS (2014)

Existem diversos métodos de diagnóstico disponíveis atualmente, porém devido a algumas limitações encontradas nas técnicas conhecidas como clássicas, associadas às próprias características dos patógenos, o que dificulta muitas vezes o diagnóstico, fica explícito a necessidade de se desenvolverem técnicas mais eficientes. Com isso, a pesquisa de material genético nas amostras clínicas se tornou uma prática comum para garantir um diagnóstico preciso, pois com o avanço das técnicas moleculares torna-se cada vez mais acessível à detecção dos patógenos (NOBREGA JÚNIOR; BARBOSA, 2013).

2.2 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO HPV

2.2.1 – Imunohistoquímica

A técnica imunohistoquímica detecta o revestimento proteico das partículas virais do HPV e é amplamente utilizada no estudo da distribuição e localização de biomarcadores e proteínas expressas em diferentes partes de um tecido biológico, como marcadores moleculares específicos da proliferação ou de apoptose. A visualização de uma interação antígeno-anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é conjugado a uma enzima, como a peroxidase, que pode catalisar uma reação que produzirá coloração. Alternativamente, o anticorpo pode também ser marcado com um fluoróforo (MARTINS, 2013).

Dentre os principais marcadores imunohistoquímicos esta a proteína nuclear pRb, produto do gene Rb. Esta proteína regular o ciclo celular por controle da

transcrição de genes celulares envolvidos na progressão do ciclo e na proliferação celular, portanto, mutações de Rb ou inativação de pRB causam proliferação celular descontrolada. Fortes evidências genéticas, epidemiológicas e bioquímicas estabeleceram que suas proteínas seriam componentes de diferentes barreiras contra o câncer (ELEOTÉRIO JÚNIOR et al., 2006).

Como E6 e E7 são oncoproteínas envolvidas no processo carcinogênico da infecção pelo HPV no qual inibem a atividade do p53 e da pRb, respectivamente, a expressão persistente dessas oncoproteínas pode servir como indicador de progressão de neoplasia intraepitelial para carcinoma invasivo. A quantificação das proteínas E6 ou E7 através da imunohistoquímica pode proporcionar um melhor valor preditivo do que a detecção de DNA viral sozinho. No entanto, a medição das proteínas E6 e E7 pode não ser a melhor das hipóteses, por estas serem produzidas em pequenas quantidades em células transformadas, e pela sensibilidade do ensaio. (MARTINS, 2013).

Nas lesões intraepiteliais e no câncer de colo a alteração no p16 pode ter um papel primordial no desenvolvimento do tumor. Assim, a expressão do p16 torna-se um possível marcador para a diferenciação de lesões neoplásicas daquelas reativas ou hiperplásicas na cérvix (ELEOTÉRIO JÚNIOR et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que a proteína p16 está presente em quase 100% dos casos de HSIL, carcinomas escamosos e adenocarcinoma *in situ*, além de, auxiliar nos casos de LSIL associados ao HPV de alto risco. A análise da p16 pode também ser útil nos casos em que a citologia não distingue HSIL de alterações inflamatórias, reativas ou mesmo do epitélio normal. Deste modo, considera-se que a expressão da p16 pode ser usada como marcador prognóstico de risco de cancro cervical invasivo em mulheres infectadas pelo HPV. Mas em condições de stress fisiológico a p16 é expressa para bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose, logo é possível obter resultados positivos da coloração imunohistoquímica de p16 em epitélios escamosos e metaplásicos normais, no entanto a expressão da proteína é maior no carcinoma invasivo do colo do útero. A p16 revelou-se um marcador de lesão cervical promissor (WESTRA, 2012).

Podemos observar que a imunohistoquímica apresenta alta especificidade, porém detecta somente os vírus na forma episomal, isto é, não integrado ao genoma do hospedeiro, predominante nas lesões de baixo grau. A sensibilidade é

menor quando há integração do genoma viral ao da célula hospedeira, como nos casos de lesões intraepiteliais de alto grau, carcinomas e adenocarcinomas (HAVRECHAK, 2002).

2.2.2 – Testes imunológicos

A detecção da infecção pelo HPV através de testes sorológicos não é usado como rotina na maioria dos laboratórios. É sabido que os primeiros ensaios de sorologia desenvolvidos revelaram uma baixa sensibilidade e especificidade. A frequência e o título de vários anticorpos expressos contra o HPV mostraram uma grande variabilidade que depende do tipo de HPV presente na infecção e do epítipo reconhecido. Foi estudado em meio experimental, que a resposta humoral ocorre com uma rápida resposta de IgM e IgA, seguida do desaparecimento da IgM, uma diminuição da IgA e aparecimento de níveis estáveis de IgG (MARTINS, 2013).

O uso da sorologia como possível marcador de infecção por HPV no colo uterino mostra dificuldades devido às reações cruzadas entre os diferentes tipos de HPV, que podem infectar diversas partes do organismo, assim como a fraca resposta das células imunocompetentes das camadas superficiais do epitélio, onde se dá a expressão viral do HPV (RAMA et al., 2006).

A abordagem que proporcionou um novo impulso aos estudos de imunologia das infecções por HPV e, em especial, ao desenvolvimento de ensaios sorológicos, foi à produção de partículas semelhantes aos capsídios virais (VLP ou *virus like particles*) de HPV-16. Estes capsídios gerados são semelhantes em conformação aos virions selvagens infecciosos, entretanto não possuem o material genético, potencialmente oncogênico, responsável pelo estabelecimento da infecção viral. Assim, a resposta imune humoral contra HPV é geralmente medida por ensaios imunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA ou *enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se VLPs de HPV tipo-específicas adsorvidas às placas (SICHERO et al., 2016).

Adicionalmente, foram desenvolvidos ensaios de ELISA que utilizam proteínas ou peptídeos recombinantes de HPV a fim de detectar com alta especificidade anticorpos contra as proteínas precoces E6 e E7. O uso destes peptídeos sintéticos permite avaliar a resposta humoral dirigida a epítipos lineares

representativos de lesões portadoras do genoma do HPV já integrado (SICHERO, 2016).

Um estudo de corte acompanhou, por três anos, níveis de anticorpos para o capsídeo do HPV 16 em relação à detecção do HPV por PCR, colhido em colo e vagina de mulheres jovens. A média de tempo entre a primeira detecção do DNA do HPV e da soroconversão foi de 8,3 meses. Houve soroconversão de 93,7% já na primeira visita e de 67,1% dos casos com infecção incidente nas mulheres onde o DNA HPV 16 foi detectado; enquanto que apenas 9,5% das mulheres com DNA HPV 16 negativas soroconverteram. Mostrando que a persistência do DNA HPV aumenta a probabilidade de persistência dos anticorpos e houve uma relação estatisticamente significativa da soropositividade com aumento do número de parceiros (RAMA et al., 2006).

2.2.3 – Biologia molecular

As técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para a detecção, identificação e quantificação dos ácidos nucleicos (DNA/RNA). O material pode ser retirado de sangue total, líquido amniótico, urina, soro, plasma, raspado bucais, uretral, cervical e de tecidos parafinados. As análises são feitas manualmente ou semi automatizadas (BARRA et al., 2011).

O diagnóstico molecular da infecção pelo HPV é importante para a triagem do vírus e é considerado mais específico e mais sensível para a detecção do mesmo. As técnicas moleculares baseiam-se, principalmente, em métodos como: captura híbrida (CH), *southern blot*, hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (PCR). Entre eles, a captura híbrida II (CHII) é o método molecular mais utilizado em nosso meio para a detecção de HPV (RODRIGUES et al., 2009).

Todavia, faz-se necessário inicialmente conhecer o genoma do patógeno a ser pesquisado. Para isso, estão disponíveis atualmente bancos de dados, por exemplo, no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), que contêm coleções de genomas sequenciados que podem ser acessados por várias ferramentas de bioinformática, que auxiliarão para o desenvolvimento de iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação do genoma viral através da PCR (NOBREGA JÚNIOR; BARBOSA, 2013).

Nos últimos anos, a Reação em cadeia da polimerase (PCR), vem sendo empregada para identificar e confirmar a presença do HPV. Esta técnica de amplificação de DNA exige quantidades reduzidas de DNA viral, permitindo assim o estudo de pequenas amostras clínicas. A PCR tem duas aplicações no diagnóstico da infecção pelo HPV: a) selecionar *primers* para tipos específicos de vírus, possibilitando assim a separação entre tipos conhecidos e desconhecidos de HPV; e b) selecionar *primers* que são comuns a vários tipos de HPV (*primers* comuns), de forma a documentar a presença de HPV sem identificar tipos específicos (KOSS; GOMPEL, 2014).

De acordo com Bringhenti e colaboradores (2010), a reação de PCR consiste na amplificação do DNA viral (HPV) utilizando-se, oligonucleotídeos MY09 e MY11 que se hibridizam no gene L1 de diferentes tipos de HPV. E, nas amostras com DNA detectado, possibilita a identificação do genótipo do HPV por meio da amplificação de regiões específicas para cada um dos vírus de alto ou baixo grau, geralmente sequências dos genes E6 e E7 dos subtipos de HPV (BRINGHENTI et al., 2010).

Na reação de PCR, além dos oligonucleotídeos e DNA alvo, participam os dNTPs (Desoxirribonucleotídeos trifosfatos), a Taq DNA polimerase, uma solução tampão (de acordo com a enzima utilizada) e $MgCl_2$ é utilizado em quantidades determinadas pelo fabricante da enzima. Os microtubos contendo as reações são colocados num termociclador onde são realizadas as fases de desnaturação, hibridização de oligonucleotídeos e extensão mediante ciclos com temperaturas determinadas e específicas para cada fase. O DNA amplificado pode ser submetido a técnicas de hidridização ou sequenciamento para identificação dos tipos de HPV encontrados no paciente. Esta técnica possui a capacidade de detectar quantidades muito baixas de carga viral, por isso ela é considerada a técnica mais sensível utilizada nesses casos (LETO, 2011).

Algumas variações da PCR convencional podem ser utilizadas no diagnóstico do HPV como o Nested PCR e a PCR em tempo real. A Nested PCR é uma variação da PCR realizada em duas etapas. Na primeira etapa um par de oligonucleotídeos hibridiza com o DNA alvo permitindo a obtenção de fragmento prévio. Na segunda etapa, oligonucleotídeos serão hibridizados ao fragmento obtido na primeira etapa, permitindo a realização da segunda etapa de PCR. O Nested PCR aumenta a

sensibilidade e especificidade em relação a PCR convencional (ARAÚJO; REIS, 2014).

A PCR em tempo real é uma variação da PCR que possibilita quantificar o número de cópias virais presentes numa amostra. O resultado é dado pelo aumento de fluorescência, proporcional a quantidade de produto amplificado. A utilização de oligonucleotídeos universais possibilita a detecção da maioria dos tipos virais do HPV. Esta técnica é considerada sensível e eficiente e apresenta a vantagem de ser mais rápida, pois, ao mesmo tempo em que se amplifica o material o mesmo já pode ser quantificado, o que não é possível na convencional (ARAÚJO; REIS, 2014).

A técnica molecular mais recente utilizada para a detecção de DNA HPV é o microarranjo. Com esta técnica é possível genotipar 24 subtipos de HPV sendo 18 tipos de alto risco e seis de baixo risco simultaneamente, após o DNA ser amplificado por PCR. O produto da PCR é hibridizado contra um microarranjo que contém sequências específicas para os 24 diferentes tipos de HPV, quando a hibridização ocorre no local específico do microarranjo significa a presença do genótipo na amostra. A vantagem dessa técnica é a possibilidade de detecção de infecções por mais de um tipo viral uma vez que a probabilidade de desenvolvimento de câncer cervical nesses casos é maior (BARRA et al., 2011).

A Captura Híbrida é um sofisticado teste de hibridização molecular, embasado na detecção pela quimioluminescência, em que o DNA-alvo são hibridizados com uma mistura específica de sondas de RNA. O híbrido resultante, composto por RNA-DNA, é capturado na superfície interna de um tubo revestido por anticorpos anti-RNA-DNA. Após isso, o híbrido imobilizado é posto para reagir com um anticorpo híbrido, conjugado com fosfatase alcalina, sendo sua detecção realizada por meio de um substrato quimioluminescente. A medida que o substrato vai sendo clivado pela fosfatase alcalina acoplada, passa a ocorrer a emissão de luz, a qual é medida por um luminômetro na forma de unidades luminosas relativas. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade do DNA-alvo na amostra (KOSS; GOMPEL, 2014).

Este método foi elaborado para fornecer estimativas quantitativas de carga viral e é considerado um método seguro, preciso e reprodutível para a detecção do HPV (CARMO; FIORINI, 2007). O referido teste é baseado em sondas de RNA específicas para 13 tipos de HPV de alto risco e 5 tipos de baixo risco. O resultado

não especifica o tipo de HPV, apenas indica se a amostra é positiva ou negativa e, se positiva, indica se o vírus é de baixo ou alto risco (VIDAL et al., 2012).

De acordo Arbyn et al. (2004) a técnica de captura híbrida (CH) é muito sensível para lesões de alto risco chegando a 94,8%, e a citologia é de 81,8%. O teste de captura híbrida para identificar o HPV, é apto de ser aplicado como análise de rastreamento primário, secundário e no seguimento de casos tratados por lesão cervical intraepitelial de alto grau (MAGALHÃES et al., 2012).

Vários autores tem demonstrado a alta concordância comparando os métodos de CH II e PCR (PCR) (MAGALHÃES et al., 2012).

Rodrigues et al. (2009) realizaram um estudo com 56 amostras para detecção do HPV comparando as técnicas de PCR e captura híbrida, verificaram que a CH II detectou 46 amostras positivas e 10 negativas, e a técnica de PCR detectou 41 amostras positivas e 15 negativas. Concluindo que, as duas técnicas se mostraram eficazes para a detecção do HPV porém, constatou que a captura híbrida se mostrou mais complexa e extensa pois foi necessário realizar duas reações distintas uma para os tipos virais de alto risco e outra para os tipos de baixo risco apresentado a captura híbrida mais resultados falso-positivos.

Nonnenmacher e colaboradores (2002) realizaram um estudo transversal com 975 participantes entre 15 e 70 anos, onde cada amostra foi dividida em dois tubos para posterior análise do DNA viral, uma pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) e outra pelo método de captura híbrida II (CHII). Em relação à tipagem viral do DNA para o HPV nas 975 mulheres, 15% dos casos testaram positivo para o CH II, enquanto 16% testaram positivos pelo método PCR (na associação dos métodos, 27% das pacientes foram positivas para DNA do HPV).

Em um estudo realizado por Nomelinil et al. (2007) no qual participaram 80 pacientes com media de idade entre 15 a 75 anos, confrontando as técnicas de CH II e PCR, a captura híbrida diagnosticou 38 pacientes com HPV de alto risco (47,5%), enquanto a PCR diagnosticou 70 casos positivos (87,5%), em relação à distribuição dos casos de acordo com o tipo de HPV diagnosticado por PCR, 14 (17,5%) eram pacientes positivo para HPV 16, enquanto 56 pacientes (70%) mostrar-se dois tipos de HPV 16 e 18 simultaneamente, contudo o performance de PCR para a detecção de NIC apresentou sensibilidade de 83,33%, e especificidade de 13,33%; com a eficiência de 25%, já o método de captura híbrida apresentou

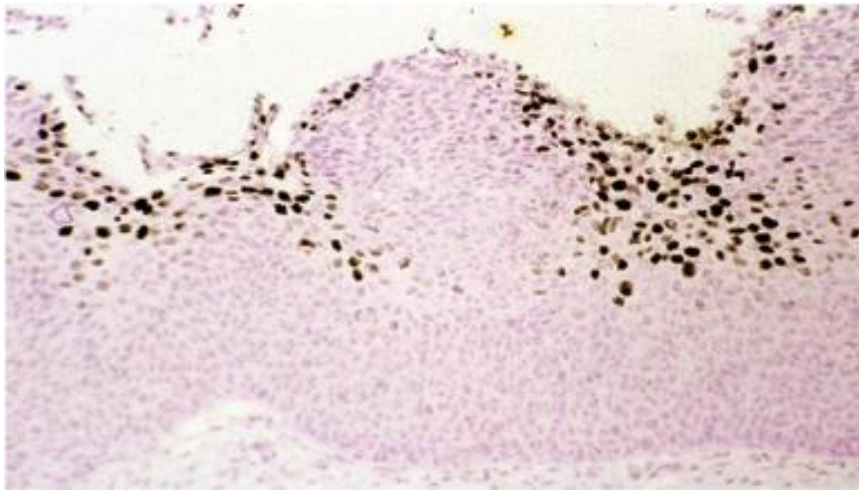
sensibilidade de 66,67%, e especificidade 56,67% e com 58,33% de eficiência, mostrando 40% de concordância entre a PCR e captura híbrida HCII (NOMELINIL et al., 2007).

Contudo Kulmala et al. (2004) mostrou concordância de 85% entre os dois métodos, onde o seu estudo comparou o desempenho da captura II com o de PCR para a detectar lesões cervicais significativas em 1511 mulheres com riscos diferentes para as infecções por HPV em três Estados da antiga União Soviética, os resultados apresentaram que o grau de concordância entre o ensaio HC II e PCR foi substancial, das 228 amostras com resultados discrepantes, 92 foram positivos pelo ensaio HC II mas negativas para PCR, enquanto que 136 amostras foram positivas para PCR, mas negativo para HC II, com a sensibilidade de detecção de 85,2 para CH II e 74,0% para PCR, e especificidade de 67,2% e 64,1% respectivamente, concluindo que as duas técnicas apresentaram baixas especificidades, mas a sensibilidade do ensaio HC II foi ligeiramente melhor. (MAGALHÃES et al., 2012).

O *Southern blot* é considerado um teste qualitativo para detecção de DNA-HPV e considerada uma técnica que possui uma alta especificidade e sensibilidade. Com ela pode-se identificar novos tipos de HPV. Ela também permite, quando utilizadas várias enzimas de restrição documentar a presença de muitos tipos virais em uma mesma amostra. Esta técnica também é capaz de definir o estado físico das sequências virais, especialmente com relação a serem elas independentes (epissomais) ou integradas ao DNA celular (KOSS; GOMPEL, 2014).

Outra técnica também usada para a detecção do material genético do HPV, mas em tecidos fixados (biópsias ou esfregaços celulares), é a hibridização *in situ* que demanda sondas de DNA ou RNA para os tipos conhecidos de vírus. As sondas podem ser radioativas (marcadas com trício ou enxofre 35) ou não radioativas (marcadas com biotina). Neste último caso, a hibridização é registrada por imunohistoquímica (KOSS; GOMPEL, 2014). (Figura 5)

Figura 5- Hibridização *in situ* de um NIC 3; HPV 16 visível apenas em células superficiais.



Fonte: Arquivo pessoal.

No entanto, as grandes vantagens da hibridização *in situ* são a possibilidade de se fazer correlação com os aspectos morfológicos e histológicos das lesões, sem necessidade de material fixado em meios especiais, permitindo a análise de biópsias ou peças cirúrgicas coletadas e fixadas em formol a 10%, material congelado, cultura de células ou preparados citológicos. Outra vantagem é que ela permite o diferencial entre os tipos de HPV de acordo com o seu potencial oncogênico. Entretanto, a sensibilidade do exame é sacrificada com essa técnica porque o DNA do espécime está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula, ao invés de encontrar-se isolado e concentrado (HAVRECHAK, 2002).

CONCLUSÃO

Observou-se que, apesar da citologia oncótica convencional ser adotada como padrão ouro para rastreamento do câncer do colo do útero e suas lesões precursoras, esta técnica pode sofrer interferentes que alteram sua sensibilidade diagnóstica, como erros na coleta e/ou coloração e até mesmo uma subjetividade na interpretação do resultado, sendo assim, necessária a implantação de técnicas moleculares de alta sensibilidade já que as mesmas detectam o material genético do vírus em pequenas quantidades de amostra.

Das técnicas diferenciais utilizadas para identificação do HPV destacam-se as moleculares na qual a captura híbrida e a PCR são consideradas mais importantes, sendo o primeiro método citado mais propenso a resultados falso-positivos. A PCR aliada à citologia oncótica convencional é de extrema importância para o diagnóstico do HPV, pois auxilia em um melhor prognóstico diminuindo assim os novos casos de câncer de colo uterino e suas consequências.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Alline Santos; REIS, Christian Robson de Souza. **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO: SITUAÇÃO ATUAL**. Artigo de conclusão de curso. UNINASSAU – PE, 2014.

ARBYN, M.; BUNTINX, F.; VAN RANST, M.; PARASKEVAIDIS, E.; MARTINHIRSCH, P.; DILLNER, J. 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**. 2004 feb 18;96(4);280-93.

ASSUNÇÃO, Jéssica Gabriela Fernandes; CORREIA, Amanda Kelly de Araujo. Análise comparativa das técnicas de biologia molecular para genotipagem do Papilomavírus Humano – HPV. **Revista científica da escola de saúde** Ano 3, nº 2, abr. / set. 2014.

BARBOSA-FILHO, RAA; ROCHA, DAP; SANTOS, CMB; ASTOLFI-FILHO, S. **Sequenciamento genético e análise molecular do Papilomavírus humano 16 isolado na Amazônia**. Resumo apresentado no 56º Congresso Brasileiro de Genética. ISBN 978-85-89109-06-2. Guarujá – SP, 2010.

BARRA, GB; CAIXETA, CSASB; COSTA, PGG; SOUSA, CF; VELASCO, LFR. Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. **RBAC**. 2011; 43 (3):254-60.

BRINGHENTI, MEZ; DOZZA, TG; MARTINS, TR; BAZZO, ML. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). **DST - J bras Doenças Sex Transm 2010**; 22(3):135-140.

BURD, EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev** 2003; 16(1):1-17.

CAMARA, Geni N. N. de Lima; CRUZ, Márcio Rojas; VERAS, Verônica Sales; MARTINS, Cláudia Renata F. **Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico**. Universitas Ciências da Saúde - vol.01 n.01 - pp. 149-158, 2008.

CARMO, EFS; FIORINI, A. Principais Técnicas Moleculares Para Detecção Do Papillomavirus Humano. **Rev. Saúde e Biol**. 2007; vol 2, n. 1 29-31

CASTRO, TMPG; FILHO, IB; NASCIMENTO, VX; XAVIER, SD. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **J bras Otorrinolaringologia**. 2009; 75 (2): 167-171.

DA SILVA, Terezinha Tenório; GUIMARÃES, Mariléa de Lima; BARBOSA, Maria Isabel de Castro; PINHEIRO, Maria de Fátima Garpar; MAIA, Angelina Farias. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2006; 28(5): 285-91.

DE REZENDE, Marcela Cardoso. **O Papiloma Vírus Humano (HPV) e o Câncer de colo de útero**. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas). Brasília – DF. Faculdade de Ciências da Saúde, 2001.

DE SÁ, Rayanne Oliveira; DE SÁ, Ieda Maria Leão Coelho; GOMES JÚNIOR, Antonio Luiz. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA. **Revista GEINTEC** – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2016. Vol. 6/n. 1/ p.2851-2860 2851 D.O.I.: 10.7198/S22370722201600010009.

DEMATHE, A; GARCIA, JF; MATTAR, NJ; SIMONATO, LE; MIYAHARA, GI. Detecção do papiloma vírus humano (HPV) em carcinoma espinocelular de lábio: correlação com aspectos clínicos e fatores de risco. **Rev Bras Epidemiol**, 2011; 14 (1): 98-105.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**. 2005; 32S:S7–S15.

DOS PRAZERES, Benedito Antonio Pinheiro. **Prevalência do HPV em material cérvico – uterino de mulheres de Tomé-Açu – PA**. Dissertação (Mestrado em Doenças tropicais). Belém – PA. Universidade Federal do Pará, 2011.

FERRAZ, Laís de Campos; SANTOS, Ana Beatriz Rossetti; DISCACCIAT, Michelle Garcia. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J Health Sci Inst**. 2012;30(2):107-11.

FERRAZ, LC; SANTOS, ABR; DISCACCIATI, MG. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J Health Sci Inst**. 2012; 30(2): 107-11.

HAVRECHAK, Gisele Cristina. **O Papiloma Vírus Humano (HPV) e a sua influência no Câncer do Colo do Útero**. (Monografia) Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília. Brasília, 2002.

Instituto do HPV. **Guia do HPV**: Entenda de vez os papilomavírus, as doenças que causam e o que já é possível fazer para evitá-los. Julho, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2015. ISBN 978-85-7318-283-5 (versão eletrônica).

KENNE, Edilaine Leimann; GASSEN, Marina; DOS SANTOS, Clairton Edinei; REIS, Luiza Naujorks; BULLÉ, Danielly Joani; RENNEN, Jane Dagmar Pollo. Diagnóstico molecular de HPV em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam o papanicolaou. **Revista Cinergis** 2014;15(4):201-206.

KOSS, Leopoldo G.; GOMPEL, Claude. **Introdução a citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas**. ISBN 078-85-7241-605-4. Roca, São Paulo, 2014.

KULMALA, S.M.; SYRJÄNEN, S.; SHABALOVA, I.; PETROVICHEV, N.; KOZACHENKO, V.; PODISTOV, J.; IVANCHENKO, O.; ZAKHARENKO, S.; NEROVJNA, R.; KLJUKINA, L.; BRANOVSKAJA, M.; GRUNBERGA, V.; JUSCHENKO, A.; TOSI, P.; SANTOPIETRO, R.; SYRJÄNEN, K. Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 2470-5, 2004.

LETO, MGP; SANTOS JR, GF; PORRO, AM; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An Bras Dermatol**. 2011; 86(2):306-317.

MAGALHÃES, Hugo Alves; LUZ, Jó Evangelista Batista; CORREIA, Matheus Silva; Faria, Raimundo. **PAPILOMAVÍRUS HUMANO: AS TÉCNICAS MOLECULARES: CAPTURA HÍBRIDA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**. Artigo de conclusão de curso. Faculdade Guanambi, 2012.

NASCIMENTO, Marcos Aurélio Guimarães; ANDRADE, Fábio Asmar. Estudo comparativo entre citologia convencional e citologia em base líquida –revisão bibliográfica. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. s/d.

NÓBREGA JÚNIOR, Francisco Daves; BARBOSA, Rodrigo Niskier Ferreira. Abordagem *in silico* para Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex do DNA de Papilomavírus Humano e de *Chlamydia trachomatis*. **NewsLab** - edição 120 – 2013.

NOMELINII, R.S.; BARCELOS, A.C.M.; MICHELINII, M.A.; ADADIII, S.J.; MURTA, E.F.C. Utilization of human papillomavirus testing for cervical cancer prevention in a university hospital. **Cad. Saúde Pública** vol.23 no.6 Rio de Janeiro, June 2007.

NONNENMACHER, Bernadete; BREITENBACH, Vanessa; VILLA, Luisa Lina; PROLLA, João Carlos; BOZZETTI, Mary Clarisse. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Rev Saúde Pública** 2002;36(1):95-100.

PINTO, VFC; BARBOSA, VFC; PAIVA, SG. Aspectos epidemiológicos e citológicos de infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) em adolescentes: uma revisão. **Rev Científica do ITPAC**. 2012; V.5 pub. 4.

RAMOS, Eleni Souto Nóbrega; REZENDE, Cynthia de Araújo Mafaldo; CAVALCANTI JUNIOR, Geraldo Barroso; DA SILVA, Daliana Caldas Pessoa. Avaliação da sensibilidade da citopatologia através de estudo comparativo com a colposcopia em portadoras de lesões cervicais induzidas pelo papilomavírus humano. **RBAC**, vol. 41(3): 177-179, 2009.

RIVOIRE, Waldemar Augusto; CAPP, Edison; CORLETA, Helena von Eye; DA SILVA, Ilma Simoni Brum. BASES BIOMOLECULARES DA ONCOGÊNESE CERVICAL. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2001, 47(2): 179-84.

RODRIGUES, AD; CANTERELLI, VV; FRENTZ, MA; PILGER, DA; PEREIRA, FS. Comparação das Técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J Bras Patol Med Lab**, v 45, n 6, p. 457-462, 2009.

SANTOS, IM; MAIORAL, MF; HAAS, P. **Infecção por HPV em homens: Importância na transmissão, tratamento e prevenção do vírus.** *Estud Biol.* 2010/2011 jan/dez;32/33(76-81):111-18. ISSN 0102-2067.

SICHERO, Laura; BOCCARDO, Enrique; VILLA, Luisa Lina. **HPV nas Mulheres Métodos de Diagnóstico.** Disponível em: <http://hpvinfo.com.br/hpv-livro-6-hpv-nas-mulheres-metodos-de-diagnostico/> acesso 09 de novembro de 2016 as 21:30.

SOUTO, Rafael; FALHARI, Júlio Pedro Borgo; DA CRUZ , Aparecido Divino. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia** 2005; 51(2): 155-160.

VIDAL, Flávia Castello Branco Vidal; NASCIMENTO, Maria do Desterro Soares Brandão; FERRARO, Cíntia Tereza Lima; BRITO, Luciane Maria Oliveira. **Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano: revisão da literatura.** *FEMINA* | Setembro/Outubro 2012 | vol 40 | nº 5.

WHEELER, C.M.; HUNT, W.C.; CUZICK, J.; LANGSFELD, E.; ROBERTSON, M.; CASTLE, P.E. The influence of type-specific human papillomavirus infections on the detection of cervical pre cancer and cancer: A population-based study of opportunistic cervical screening in the United States. The Authors. **International Journal of Cancer Inc. on behalf of UICC Int. J. Cancer:** 135, 624–634 (2014) VC 2013.

WESTRA, WH. Detection of Human Papillomavírus in Clinical Samples. **OtolaryngolClin N Am** 45, 2012: 765-

ANEXO
DECLARAÇÃO

Eu, **Stéphanny Sallomé Sousa Oliveira**, portadora do documento de identidade RG 3325065 – SSP/PB, CPFn° 07494352406, aluna regularmente matriculada no curso de Pós- Graduação Citologia Clínica, do programa de *Lato Sensu* do INESP– Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa, sob o n° CC15010814 declaro a quem possa interessar e para todos os fins de direito, que:

1. Sou a legítima autora da monografia cujo título é: **“O HPV E SUAS PRINCIPAIS FORMAS DE DIAGNÓSTICO”**, da qual esta declaração faz parte, em seus ANEXOS;
2. Respeitei a legislação vigente sobre direitos autorais, em especial, citado sempre as fontes as quais recorri para transcrever ou adaptar textos produzidos por terceiros, conforme as normas técnicas em vigor.

Declaro-me, ainda, ciente de que se for apurado a qualquer tempo qualquer falsidade quanto às declarações 1 e 2, acima, este meu trabalho monográfico poderá ser considerado NULO e, conseqüentemente, o certificado de conclusão de curso/diploma correspondente ao curso para o qual entreguei esta monografia será cancelado, podendo toda e qualquer informação a respeito desse fato vir a tornar-se de conhecimento público.

Por ser expressão da verdade, dato e assino a presente DECLARAÇÃO,

Em Recife, 28 / Novembro de 2016.

Stéphanny Sallomé Sousa Oliveira

Assinatura do (a) aluno (a)

Autenticação dessa assinatura, pelo
funcionário da Secretaria da Pós-
Graduação *Lato Sensu*