

INSTITUTO NACIONAL DE ENSINO SUPERIOR E PESQUISA

CURSO DE CAPACITAÇÃO EDUCACIONAL

PÓS-GRADUAÇÃO EM CITOLOGIA CLÍNICA

DANIELE IDALINO JANEIRO

**ESTUDO DOS ACHADOS CITOLÓGICOS E ANÁLISE DA
QUANTIFICAÇÃO DE RNAm E6, E7 EM MULHERES PORTADORAS DE HPV
PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DO COLO UTERINO**

RECIFE

2016

DANIELE IDALINO JANEIRO

**ESTUDO DOS ACHADOS CITOLÓGICOS E ANÁLISE DA
QUANTIFICAÇÃO DE RNAm E6, E7 EM MULHERES PORTADORAS DE HPV
PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DO COLO UTERINO**

Monografia apresentada ao Centro de
Capacitação Educacional como requisito
para a conclusão do curso de Pós-
graduação “Lato Sensu” em Citologia
Clínica.

Orientador: Danilo Pontes de Oliveira
Barros

RECIFE

2016

DANIELE IDALINO JANEIRO

**ESTUDO DOS ACHADOS CITOLÓGICOS E ANÁLISE DA
QUANTIFICAÇÃO DE RNAm E6, E7 EM MULHERES PORTADORAS DE HPV
PARA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DO COLO UTERINO**

Monografia apresentada ao Centro de Capacitação Educacional, como exigência do Curso de Pós-graduação Lato Sensu em Citologia Clínica. Recife, 2016

EXAMINADOR

Nome:

Titulação:

PARECER FINAL:

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, sempre, a Deus, toda honra, glória e louvor.

A minha família amada, Juscelino e Gabrielly por todo apoio.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo por ser um referencial para mim na citologia clínica.

Aos meus cunhados Isaac, Érika, Lara e Mickael, pelo seu acolhimento e acima de tudo pela amizade.

Aos meus colegas do curso, pela troca de experiência e companheirismo.

Ao CCE cursos, pelo seu corpo docente, direção, administração, secretaria e serviços gerais, que proporcionaram um ambiente agradável e me oportunizaram o conhecimento e novas amizades.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do genoma do HPV.	29
FIGURA 2 – Esquema da degradação da p53 mediada pela E6.	31
FIGURA 3 – Associação de E7 à proteína do retinoblastoma (pRb).	31
FIGURA 4 – Principais etapas da infecção pelo HPV, evolução para câncer ou resolução da infecção.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC-US - Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado

ASC-H - Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado, não podendo excluir lesão de alto grau

AGUS - Atípias de significado indeterminado de células glandulares

DST's - Doenças sexualmente transmissíveis

HPV - Papilomavirus Humano

HSIL -Lesão Escamosa Intra-Epitelial de Alto Grau

INCA -Instituto Nacional de Câncer

JEC - Junção escamocolunar

LSIL -Lesão Escamosa Intra-Epitelial de Baixo Grau

NIC - Neoplasia Intra-Epitelial Cervical

SISCOLO -Serviço de Informação de Controle de Câncer do Colo de Útero

SUS -Sistema Único de Saúde

RESUMO

O rastreamento do câncer cervical é baseado na citologia oncótica, entretanto este é um método subjetivo, com um grau variável de resultados falso-negativos e falso-positivos. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram importante associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o câncer de colo uterino, observando que este agente está presente em 99,7% dos casos. A detecção por técnicas de triagem converteu-se na principal ferramenta preventiva da mortalidade associada ao câncer cervical. Assim, prestigiosas sociedades científicas, tanto nacionais como internacionais, recomendam realizar a triagem citológica para o diagnóstico precoce do câncer cervical com uma técnica de detecção de DNA do HPV a partir dos 30 anos. Nem todas as mulheres infectadas pelo HPV de alto risco terão um processo carcinogênico. A maioria das infecções entra em remissão espontaneamente pela ação do sistema imunológico, em um período de 8 a 12 meses. Assim, o risco oncogênico começa quando a infecção persiste, na qual o DNA do vírus integra-se ao DNA das células do epitélio cervical, produzindo a sobreexpressão de duas oncoproteínas: E6 e E7. Ambas as proteínas contribuem para a inibição da apoptose, imortalizando assim as células. E as células imortalizadas, ao alterar-se a atividade normal celular, conduzem a uma transformação anormal. De acordo com os dados encontrados neste estudo, consideramos importante, no Brasil, a mudança das estratégias de rastreamento com a associação de técnicas moleculares à citologia oncótica, pois esta parece ser uma alternativa economicamente viável. A identificação das pacientes com DNA HPV positivas seguidas da determinação do tipo viral pelo método da PCRHPVte, ou realização da expressão de E6/E7 RNAm poderá contribuir com o diagnóstico precoce do câncer cervical. A possibilidade de intervenção precoce, além de salvar vidas pode ser uma medida de economia para o SUS.

Palavras-chave: HPV, Câncer cervical, PCR, E6/E7 RNAm.

ABSTRACT

The cervical screening is based on cytology; however it is subject of a substantial degree of false-negative and false-positive results. Epidemiological and experimental studies have demonstrated an important association between Human Papilloma Virus (HPV) and cervical cancer, noting that this agent is present in 99,7% of cases. The detection screening techniques became the main preventive tool mortality associated with cervical cancer. So prestigious scientific societies, both national and international, recommend performing cytological screening for early diagnosis of cervical cancer with HPV DNA detection technique from 30 years. Not all women infected with high risk HPV will have a carcinogenic process. Most infections remits spontaneously by the action of the immune system in a period of 8 to 12 months. Thus, oncogenic risk begins when the infection persists, in which the viral DNA integrates into the DNA of cells of the cervical epithelium, producing overexpression two oncoproteins: E6 and E7. Both proteins contribute to the inhibition of apoptosis, thus immortalizing the cells. And the immortalized cells cells to alter normal cellular activity, leading to an abnormal transformation. According to the data found in this study, we consider important in Brazil, change of screening strategies with the combination of molecular techniques to cytology, as this seems to be an economically viable alternative. The identification of patients with positive HPV DNA followed by determination of the viral type by the method of PCRHPVte, or carrying out the expression of E6/E7 mRNA may contribute to the early diagnosis of cervical cancer. The possibility of early intervention, and save lives can be a saving measure for SUS.

Keywords: HPV, Cervical cancer, PCR, mRNA E6/E7.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. METODOLOGIA	13
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
4.1 CÂNCER DO COLO DE ÚTERO.....	14
4.1.1 Epidemiologia.....	14
4.1.2 Fatores predisponentes.....	15
4.1.3 Detecção precoce das lesões pré-neoplásicas do colo uterino	15
4.1.4 Nomenclatura dos resultados de citologia cervical.....	16
4.1.5 Papilomavírus Humano.....	18
4.1.5.1 Tipos de vírus.....	18
4.1.5.2 Características do vírus.....	19
4.1.5.3 Câncer Cervical.....	22
4.1.5.4 Métodos de detecção e tipagem do HPV.....	23
4.1.5.4.1 Citologia Oncótica ou Citopatologia.....	23
4.1.5.4.2 Colposcopia.....	23
4.1.5.4.3 Histopatologia.....	24
4.1.5.4.4 Sistema de genotipagem do HPV.....	24
4.1.5.4.5 Método de detecção da expressão de E6/E7 RNAm.....	25
5. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino apresenta uma alta incidência no mundo todo, sendo a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e a quarta causa de morte por câncer, nas mesmas, no Brasil. A principal estratégia utilizada para rastreamento desta neoplasia e de suas lesões precursoras é o exame citopatológico do colo uterino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Para padronizar o sistema de terminologias para este método diagnóstico, foi criado o Sistema Bethesda em uma reunião de especialistas realizada nos EUA, no ano de 1988 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1989), patrocinada pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA. Nesta reunião foram feitas algumas recomendações para que as lesões relacionadas com infecção por HPV e a neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I) fossem incluídas numa mesma categoria, denominada lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions – LSIL*), e que as neoplasias intraepiteliais cervicais de graus II e III (NIC II/III) fossem englobadas nas lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions – HSIL*). A categoria de células escamosas atípicas de significado indeterminado (*atypical squamous cells of undetermined significance – ASCUS*) (WRIGHT et al., 2002) foi também incluída. No entanto, esta categoria apresenta limitações, uma vez que não define se as alterações presentes são reparativas ou neoplásicas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 1989).

Por este motivo, o Sistema Bethesda foi revisado em 2001 e as alterações, anteriormente classificadas como ASCUS, foram subdivididas em células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H). Essa nova classificação foi uma tentativa de refletir melhor as alterações que, apesar de menos definidas, poderiam representar lesões precursoras do câncer do colo do útero (BRASIL, 2011) e que, por isso devem ser encaminhados imediatamente para colposcopia. As diretrizes clínicas frente a essas alterações foram revistas em 2011.

Embora as atipias citológicas sejam mais frequentemente de baixo grau, existe o risco de progressão para lesão de alto grau e carcinoma se não tratadas, especialmente, se envolvem infecção por subtipos de HPV de alto risco.

Embora as lesões citológicas sejam mais frequentemente de baixo grau, existe o risco de progressão para lesão de alto grau e carcinoma se não tratadas, especialmente, se envolvem infecção por subtipos de HPV de alto risco. Apesar da importância do HPV na etiopatogenia do câncer cervical já ter sido confirmada, mesmo nos casos de adenocarcinomas, um período prolongado de latência é observado entre a instalação da infecção viral e o aparecimento do câncer cervical. No entanto, nem todas as pacientes que desenvolvem a infecção pelos reconhecidos HPVs de alto risco apresentarão câncer cervical, sugerindo a existência de cofatores necessários à transformação neoplásica das lesões precursoras.

A relação entre os hábitos sexuais (promiscuidade, grande número de filhos, início precoce da atividade sexual e infecções ginecológicas repetidas) e o câncer do colo uterino levou à identificação do Papillomavirus humano (HPV) como principal fator causal.

Dados epidemiológicos e moleculares mostram que a presença contínua de HPV é crucial para o desenvolvimento, manutenção e progressão do câncer do colo uterino. Como mostra a literatura, 70 % das mulheres com idade média de 23 anos eliminarão a infecção dentro de 1 ano após a detecção, indicando a importância do papel do sistema imunológico no estágio inicial desse processo. Apenas uma pequena parte das mulheres infectadas desenvolverá câncer. Assim, é relevante desenvolver nova metodologia para detectar mulheres que irão desenvolver possivelmente câncer do colo uterino.

Os métodos mais utilizados para detectar lesão por HPV incluem, principalmente, pelo baixo custo, a citologia tradicional, além de métodos mais sofisticados como extração de DNA total para detecção das sequências de HPV de alto risco. No entanto, nenhum desses métodos são capazes de estimar a atividade dos oncogenes virais, um evento necessário de sinalização de transformação celular. Sob a hipótese de que o câncer cervical ocorre através da integração do HPV e expressão subsequente dos oncogenes E6 e E7, a quantificação destas proteínas oncogênicas necessárias para a manutenção de um fenótipo maligno pode ser mais útil para a avaliação da presença e progressão das lesões.

Desta forma, este trabalho objetiva avaliar o ensaio do uso quantitativo de E6 e E7 RNAm (HPV OncoTect, Incell DX, Menlo Park, California) para determinar a sobre-expressão destes marcadores oncogênicos célula por célula, , uma vez que os oncogenes E6 e

E7 conduzem a transformação da célula cervical, de forma a estimar a contribuição dos testes moleculares ao diagnóstico precoce do câncer cervical.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o desempenho da quantificação do RNAm E6, E7 para a detecção de carcinoma cervical e suas lesões precursoras.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a prevalência do HPV relacionado ao câncer cervical;
- Determinar possíveis fatores prognósticos ou preditivos para os carcinomas de colo uterino, por meio da detecção de HPV e avaliação dos marcadores E6, E7 e a correlação destes marcadores com a sobrevida global das pacientes.

3. METODOLOGIA

O tipo de estudo utilizado relacionado ao tema foi análise bibliográfica. As bases de dados online pesquisadas foram: LILACS (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde) do Sistema BIREME (Centro Latino-americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde) e ScieELO (Scientific Electronic Library Online). As buscas textuais foram realizadas para os seguintes descritores: *Papillomavirus* Humano, epidemiologia, diagnóstico e E6/E7 RNAm. Não houve delimitação por período. Os critérios de inclusão foram: trabalhos que versassem sobre detecção do oncogenes E6/E7 RNAm do HPV e sua aplicabilidade na triagem do câncer cervical nos idiomas português e inglês. Foram excluídos os artigos que não possuísem informações relevantes para atingir o objetivo deste trabalho.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

4.1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer do colo uterino é o quarto tipo de câncer mais comum em mulheres e, por ano, estima-se que tenha sido responsável pela morte de mais de 288 mil mulheres em todo o mundo. Cerca de 80% dessas mortes ocorrem nos países em desenvolvimento, principalmente nas regiões mais pobres (WHO, 2016).

Estima-se, para o Brasil, no ano de 2016, 16.340 novos casos de câncer do colo uterino, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. A incidência varia de acordo com a região. Na análise regional, o câncer do colo do útero se destaca como o primeiro mais incidente na região Norte do Brasil, com 23,97 casos por 100.000 mulheres. Nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, ele ocupa a segunda posição, com taxas de 20,72/100 mil e 19,49/100 mil, respectivamente, e é o terceiro mais incidente na região Sudeste (11,3/100 mil) e quarto na Sul (15,17/100 mil). No estado da Paraíba figura como o segundo tipo de câncer mais frequente entre população feminina, apresentou uma taxa estimada de 19,29 novos casos para cada 100 mil mulheres em 2014 (INCA, 2015).

Estudos epidemiológicos mostram que a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é causa necessária, mas não suficiente, para a ocorrência do câncer do colo do útero (AYRES; SILVA, 2010). Baixas coberturas do exame de rastreamento e modificações na exposição aos fatores de risco para infecção pelo HPV têm sido descritas nas análises da situação epidemiológica do câncer do colo do útero (BOSCH et al., 2008; MARTINS; THULER; VALENTE, 2005).

O câncer de colo do útero por ser uma doença de evolução lenta se configura como um dos tipos de câncer com possibilidade de detecção precoce. O elevado número de casos torna necessário a realização do exame citológico cervicovaginal, que constitui a forma mais eficaz para a detecção precoce dos casos de carcinoma cervicais e outras alterações na citologia feminina. O diagnóstico em estágio inicial garante o acompanhamento e tratamento das lesões precursoras neoplásicas, bem como uma maior chance de sucesso da terapêutica contra o câncer de colo uterino.

4.1.2 FATORES PREDISPOONENTES

Diversos são os fatores que podem desencadear o surgimento de lesões intraepiteliais do colo uterino, entre eles, multiplicidade de parceiros sexuais e a história de infecções sexualmente transmitidas entre os parceiros, multiparidade, idade precoce na primeira relação sexual (LIMA;PALMEIRA;CIPOLOTTI, 2006). Estudos ainda não conclusivos, sugerem que o tabagismo, idade, situação conjugal e baixa condição sócio-econômica tem sido apontada como fatores de risco importantes para o desenvolvimento desta neoplasia (ALBUQUERQUE et al, 2009).

Infecção de células normais por HPV, parece estar condicionada a fatores relacionados ao vírus (subtipo do vírus, infecção simultânea por vários tipos oncogênicos e a carga viral), e a fatores relacionados ao hospedeiro (imunidade e número de partos) e a co-fatores exógenos (tabagismo, co-infecção pelo HIV ou outros agentes de transmissão sexual e uso prolongado de contraceptivos orais) (ANJOS et al., 2010).

Os HPVs oncogênicos são importantes na persistência e na progressão da infecção, especialmente o HPV16, seguido pelo HPV18. Estudos têm demonstrado associação entre a carga viral e aumento de frequência de câncer cervical. A integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira usualmente é observada em carcinomas invasivos e em linhagens celulares de carcinoma cervical, mas nas lesões benignas e pré-malignas o DNA do HPV usualmente são extracromossômicos. Nos casos que evoluem para câncer, os genomas que estão mantidos de forma epissomal passam, em algum momento, a integrar o genoma da célula do hospedeiro, causando alterações morfológicas da célula, alterando seu controle do ciclo celular e levando a lesões precursoras (ROSA et al., 2009). Essa interação é considerada necessária para a transformação maligna das células epiteliais, que se tornam imortais (FERENCZY; FRANCO, 2002).

4.1.3 DETECÇÃO PRECOCE DAS LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO

A detecção precoce do câncer do colo do útero adotadas em vários países e no Brasil baseiam-se no exame citológico cervical. Atualmente, dois principais métodos para realização deste exame: a citologia cervical convencional e a citologia em meio líquido (IARC, 2005). A citologia cervical convencional é também chamada de exame de Papanicolaou, em homenagem ao seu criador, o médico greco-americano George Nicholas Papanicolaou. Seus

estudos foram publicados em 1928 e tiveram maior aceitação a partir de 1943, com o aperfeiçoamento do procedimento. Neste exame, são obtidas amostras do epitélio do colo do útero por esfregaço (esfoliação), através do uso combinado de espátula de Ayre e de escova endocervical ou de escovas de coleta simultânea (IARC, 2005). A amostra precisa ser rapidamente fixada em lâminas e após visualização e classificação segundo técnicas citológicas, é possível diagnosticar anormalidades celulares compatíveis com lesões precursoras ou próprias do câncer do colo do útero.

A citologia cervical em meio líquido surgiu com o aperfeiçoamento das técnicas de coleta e citologia, na metade da década de 90. De um modo geral, compreende utilização de um meio líquido para transporte, fixação e preservação celular de amostras de epitélio coletadas. Tais amostras são obtidas a partir da utilização de uma escova cônica passada sobre o orifício cervical externo, que permite esfoliar células da exocérvice, da junção escamocolunar e da endocérvice. A conservação da amostra é útil para posterior análise, incluindo as do espectro da biologia molecular, e estas podem ser preparadas para visualização em lâminas ou por citocentrifugação (IARC, 2005). A citologia em meio líquido tem, como vantagens, uma maior representatividade de células do colo do útero nas lâminas produzidas a partir deste teste de detecção, com menor número de material celular residual indesejável, e que seria mais sensível à detecção de lesão intra-epitelial de alto-grau.

4.1.4 NOMENCLATURA DOS RESULTADOS DE CITOLOGIA CERVICAL

A nomenclatura utilizada para denominar os achados citológicos cervicais evoluiu acompanhando os progressos obtidos com o desenvolvimento das técnicas de citologia, originalmente propostos por Papanicolaou, em 1941 (Pedrosa, 2003).

A terminologia inicialmente proposta, desenvolvida por Papanicolaou e Traut designava as seguintes categorias:

classe I - ausência de células atípicas ou anormais;

classe II - citologia atípica, porém sem evidência de malignidade;

classe III - citologia sugestiva, mas não conclusiva para malignidade;

classe IV - citologia fortemente sugestiva de malignidade;

classe V - citologia conclusiva para malignidade.

Em 1968, um novo sistema classificatório foi proposto por Richart, incorporando conceitos de descrições histológicas de Reagan de 1953, buscando diminuir a discordância entre as escalas classificatórias e aumentar a sua correlação, bem como bem como refletir o avanço no conhecimento sobre a patogênese do câncer do colo do útero (IARC, 2005). Assim, para as alterações citológicas cervicais, as categorias de classificação seriam denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC): NIC 1, NIC 2 e NIC 3 de Richart e corresponderiam, respectivamente, às categorias displasia leve, displasia moderada e displasia acentuada e carcinoma *in situ*, denominação atribuída às categorias de classificação histológica de Reagan, adotada pela Organização Mundial de Saúde. A terminologia de Richart ainda é utilizada em resultados de exames histológicos e em alguns países, até em laudos de citologia.

O Sistema Bethesda, proposto em 1988, surgiu a partir de um encontro realizado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, a partir da crescente demanda de padronização internacional e de aumento de interlocução entre pesquisadores e clínicos. A nova classificação substituiu as categorias neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) 1 e 2 por lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL), e a categoria NIC 3 por lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL), tomando por base a similaridade do comportamento evolutivo para doença invasora dessas lesões, e sua correspondência cito-histológica (National Cancer Institute Workshop, 1989).

O Brasil, a partir de 2006, traduziu a Classificação Bethesda revisada, de 2001 para a língua portuguesa e adotou esta nomenclatura, atualmente preconizada pelo Ministério da Saúde. Desta forma, o resultado do exame citológico cervical pode ser classificado como (Ministério da Saúde, 2006):

-citologia normal;

-alterações celulares benignas:

- inflamação sem identificação de agente
- metaplasia escamosa imatura
- reparação – fase final do processo inflamatório;
- atrofia com inflamação
- radiação – persistência de neoplasia residual ou recidivante após radioterapia, nos casos de câncer do colo do útero.

E para os resultados considerados anormais:

- alterações celulares pré-malignas
- células escamosas atípicas de significado indeterminado

- células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não-neoplásicas
- células escamosas atípicas de significado indeterminado, quando não se pode excluir lesão intra-epitelial de alto grau
- células glandulares atípicas de significado indeterminado, tanto para as possivelmente não-neoplásicas quanto para aquelas em que não se pode afastar lesão intra-epitelial de alto grau
- células atípicas de origem indefinida, possivelmente não-neoplásicas e que não se pode afastar lesão de alto grau
- lesão intra-epitelial de baixo grau/LSIL
- lesão intra-epitelial de alto grau/HSIL
- adenocarcinoma in situ/invasor
- lesão de alto grau não podendo excluir microinvasão ou carcinoma epidermóide invasor

4.1.5 PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

4.1.5 .1 Tipos do vírus

Conforme risco epidemiológico, o vírus do HPV foi classificado em alto e baixo risco. Os de baixo risco são geralmente encontrados em condilomas vulvo-genitais e os de alto risco são associados ao câncer cervical. Foram classificados como vírus de alto risco, os tipos: 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, e 58, sendo que os tipos 26, 53 e 66 poderiam também ser considerados de provável alto risco. Os tipos de baixo risco são: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72,81, e CP6108 – e os tipos 34, 57 e 83 – não foram detectados em nenhuma das amostras e foram, portanto, consideradas de risco indeterminado (Munoz et al., 2003).

A incidência de infecções por HPV de alto risco é mais elevada do que a de baixo risco. O HPV tipo 16 é o mais prevalente nas infecções do trato genital, chegando até 66%, seguido dos tipos 18(15%), 45(9%) e 31(6%) sendo que os 4 tipos juntos, podem corresponder até a 80% dos casos (MOSCICKI et al., 2001; RICHARDSON et al., 2003; MUÑOZ et al., 2004). O tipo 16 também é o tipo mais comum detectado no carcinoma cervical invasor e o tipo mais prevalente em quase todas as partes do mundo (IARC, 2005). Em relação ao tempo de duração, o tipo 16 também é o mais persistente, com duração de 12 meses ou mais, enquanto infecções por outros tipos de HPV duram 6-8 meses (GALLOWAY, 2003). Portanto, mulheres com HPV 16 e 18 têm um risco aumentado de desenvolver câncer cervical quando comparadas com as que têm outros tipos.

A maior parte das infecções por HPV são benignas e elas desaparecem espontaneamente dentro de 1 a 5 anos (BURD, 2003). Nem todas as pacientes que desenvolvem a infecção pelos reconhecidos HPVs de alto risco apresentarão câncer cervical, sugerindo a existência de cofatores necessários à transformação neoplásica das lesões precursoras (ABREU, 2006).

4.1.5 .2 Características do vírus

O vírus é relativamente pequeno, não-envelopado, com 55 nm de diâmetro. O genoma deste vírus é uma molécula com DNA duplo com cerca de 8000 bases pareadas, com três regiões: uma região distal (L), contendo dois genes, L1 e L2, que codificam as cápsulas das proteínas virais; uma região proximal (E) que codifica as proteínas envolvidas na replicação viral e controle de transcrição denominadas de E1 e E2, e dos principais genes que se transformam em E6, E7 e E5; e, por último, entre as regiões E e L, encontra-se uma longa região de controle (LCR), vinculada a vários locais que contêm fatores de transcrição nucleares e virais e divulgador de sequências (BURD, 2003; VILLA, 2006), como demonstrado na Figura 01.

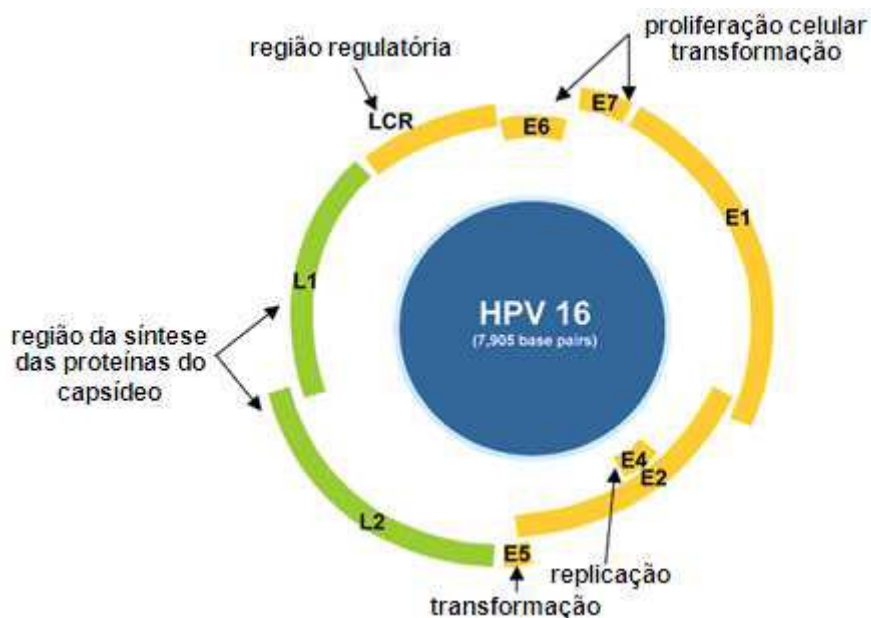


Figura 01- Representação esquemática do genoma do HPV (VILLA, 2006).

Genomas do HPV são encontrados no núcleo das células infectadas do colo uterino normal, onde partículas virais infectantes podem ser isoladas. Em algumas lesões de baixo grau e, na maioria das lesões de alto grau e do câncer cervical, genomas do HPV são

encontrados integrados aos cromossomos (Burd, 2003), sendo essa integração o ponto central da transformação celular oncogênica. A integração do DNA do HPV desregula a expressão do E6 e E7, que interagem com genes supressores tumorais p53 e proteínas RB, respectivamente. Este processo prejudica a função do gene onco-supressor, com reparação do DNA, diminuição apoptose, e eventual morte celular. As mutações cromossômicas causam modificações funcionais como perda de heterozigose e prooncogene e ativação de mecanismos que permitem a indução da carcinogênese cervical (MÜNGER; HOWLEY, 2002).

O ciclo replicativo do HPV difere de todas as outras famílias de vírus. A infecção viral requer a viabilidade de células epiteliais de mucosa ou epiderme que ainda são capazes de proliferar (célula da camada basal).

O papel mais importante na transformação maligna mediada por HPV pode ser atribuído aos genes E6 e E7 e suas respectivas proteínas. Eles são consistentemente expressos em tecidos malignos e a inibição da sua expressão bloqueia o fenótipo maligno celular do câncer cervical. Independentes na função de imortalizar vários tipos celulares humanos em cultura de tecidos, suas eficácias aumentam quando expressos em conjunto (ABREU, 2006).

Várias funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7. Observações iniciais revelaram que E6 interage com a proteína supressora p53 (figura 02) e E7 interage com a proteína do retinoblastoma (RB) (figura 03) para bloquear a atividade desses supressores de tumor. E6 e E7 podem imortalizar células humanas independentemente, mas com eficácia reduzida. A junção das suas duas funções resulta em marcado aumento da atividade de transformação. Isso se deve a um interessante efeito complementar e sinérgico. A proteína E6 parece ser danificada pelo Inibidor de cinase 4^a (INK4A). Entretanto, a proteína E7 suprime essa inibição por ativação direta das ciclinas A e E. Em resposta, E6 previne a apoptose induzida por E7, acarretando a degradação da proteína p53 e BAK, indutoras de apoptose (zur HAUSEN, 2002).

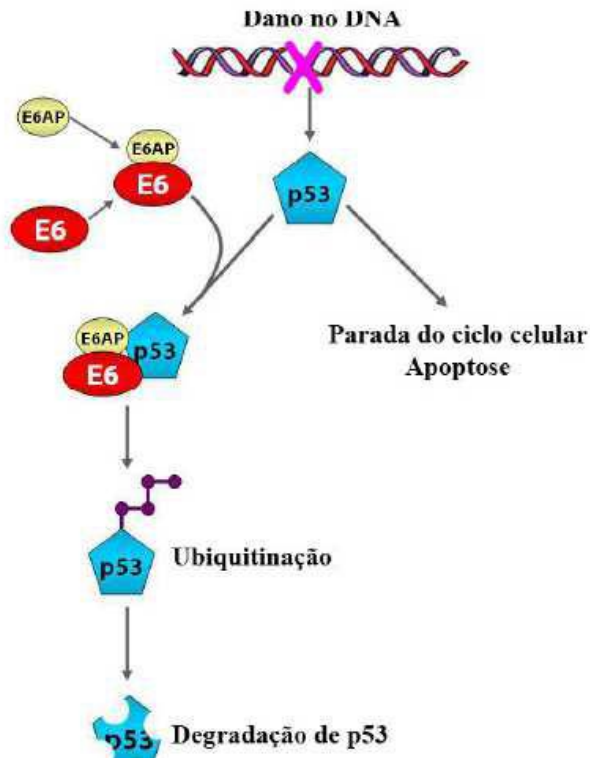


Figura 02- Esquema da degradação da p53 mediada pela E6. Danos no DNA induzem a ativação de p53 o que leva tanto à parada do ciclo celular quanto à apoptose. E6 se liga à E6-AP e o complexo formado se liga a p53. E6-AP ubiquitina a p53, que é rapidamente degradada pelo proteossomo (JO&KIM, 2005).

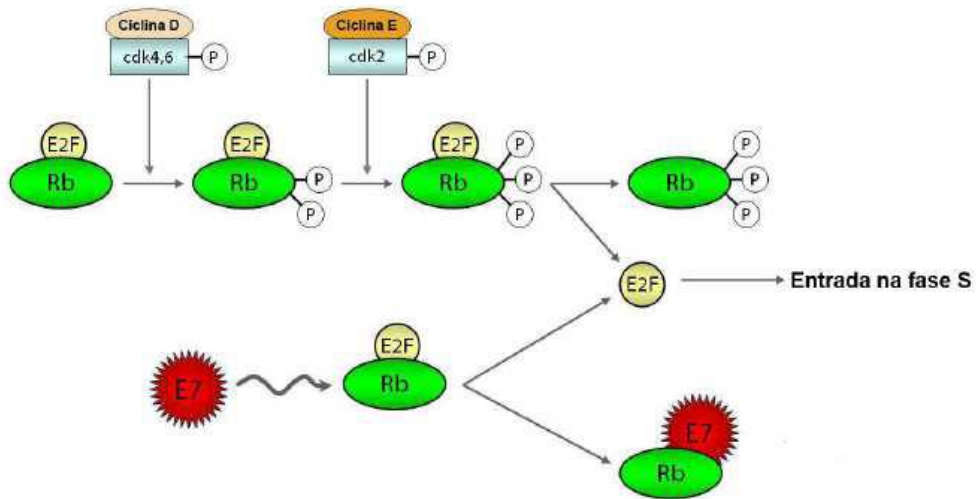


Figura 03- Associação de E7 à proteína do retinoblastoma (pRb). A fosforilação sequencial da proteína pRb por complexos ciclina/CDK inibe a atividade repressora de pRb. E7 se liga à pRb em sua forma hipofosforilada. Esta ligação desfaz o complexo entre pRb e o fator de

transcrição celular E2F, resultado na liberação deste fator, o que permite que a célula entre na fase S do ciclo celular (JO & KIM, 2005).

4.1.5 .3 Câncer Cervical

Embora tenha sido demonstrada a forte associação entre a progressão neoplásica relacionada ao HPV e o estado imunológico do indivíduo, os mecanismos que desencadeiam a resposta imunológica eficiente, contra as lesões provocadas pelo HPV, ainda não estão completamente elucidadas (MOODY & LAIMINS, 2010).

Os HPVs oncogênicos têm tropismo por células do epitélio metaplásico na Junção Escamo Colunar (JEC), as infectam e podem induzir sua transformação a células neoplásicas. Além da cérvix uterina, os HPVs de alto risco também estão associados com câncer de pênis, vulvar, anal e contribuem em mais de 40% para o desenvolvimento do câncer oral (MOODY & LAIMINS, 2010).

As principais etapas para o desenvolvimento do câncer cervical incluem infecção do epitélio metaplásico na JEC da cérvix uterina, por um ou mais tipos oncogênicos do HPV, persistência viral, progressão para lesões pré-neoplásicas e carcinoma *in situ* ou invasor. No entanto, pode ocorrer uma reversão destas etapas, com eliminação da infecção pelo HPV e regressão das lesões pré-neoplásicas (STEBEN & FRANCO, 2007).

A figura 04 mostra, na forma esquemática, as principais etapas da transição da infecção do HPV para o câncer cervical.

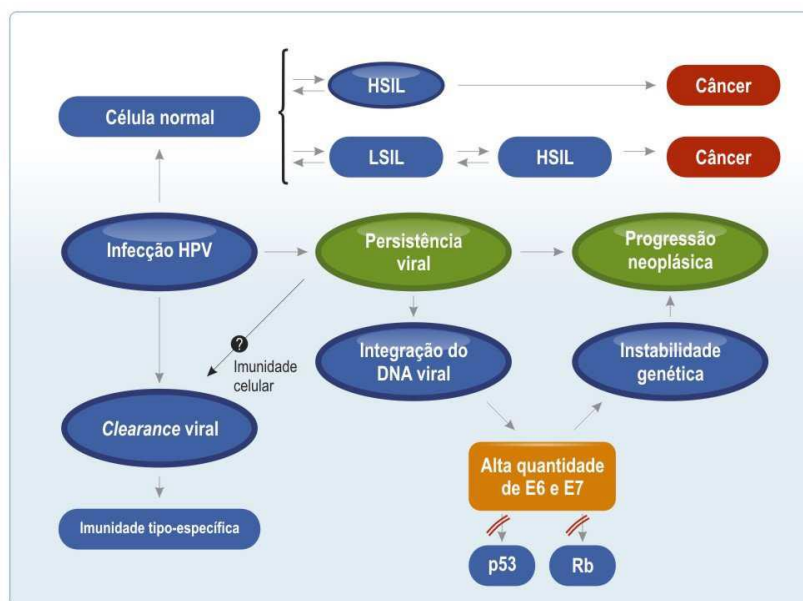


Figura 04- Principais etapas da infecção pelo HPV, evolução para câncer ou resolução da infecção (BOSCH et al., 2002). HSIL, LSIL referem-se a nomenclatura para laudos de

citologia oncótica, segundo a codificação do Sistema de Bethesda para citopatologia cérvico-vaginal, apresentada no item 4.1.4 desta monografia.

4.1.5 .4 Métodos de detecção e tipagem do HPV

Muitos métodos para triagem do câncer cervical e da infecção por HPV são empregados, como: os exames citológicos, a colposcopia (infecção subclínica) e a biópsia cervical, os quais apenas sugerem a existência de infecção pelo HPV através das alterações celulares morfológicas (efeito citopático). Nos últimos anos, os testes moleculares passaram a ser uma importante ferramenta para confirmação da infecção.

4.1.5 .4.1 Citologia Oncótica ou Citopatologia

É o principal método de rastreio do câncer cervical, embora o tecido necrótico, o sangramento e as células inflamatórias possam prejudicar a visualização de células neoplásicas (INCA, 2015). Esse teste apresenta um número elevado de resultados falso-negativos que variam em torno de 15% a 50% e percentuais de resultados falso-positivos de 10% em média (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006). Desta forma, a citologia oncótica não tem sensibilidade aceitável para a detecção do adenocarcinoma cervical e seus precursores (LIE & KRISTENSEN, 2008). Assim, um esfregaço negativo em uma paciente sintomática nunca deve ser considerado como resultado definitivo (INCA, 2015). Cerca de 40% dos casos de câncer cervical ocorrem em mulheres que recentemente receberam um resultado negativo de citologia oncótica (ALTIOK, 2003).

Entretanto, os países desenvolvidos com programas de prevenção organizados e que empregaram, como medida preventiva, a citologia oncótica diminuíram muito os casos de cânceres cervicais (SASLOW, 2002; NELSON et al., 2000; MONSONEGO et al., 2010), mas pela sua baixa sensibilidade, métodos complementares vêm sendo estabelecidos ao longo dos anos, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce da doença cervical.

4.1.5 .4.2 Colposcopia

A colposcopia é um exame visual especializado do colo uterino, da vagina, e da vulva (parte externa da vagina). O colposcópio tem uma lente que amplia de 4 a 40 vezes o epitélio, no qual se aplica uma solução de ácido acético com concentração entre 3% e 5%, e onde

houver anormalidades histológicas o epitélio torna-se esbranquiçado (acetobranco) devido à precipitação de proteínas. Durante o exame amostras das regiões suspeitas podem ser coletadas e biopsiadas. É um exame importante para a detecção das lesões causadas pelos HPV, entretanto, outras situações como, por exemplo, inflamações intensas, no entanto, também expressam um epitélio branco. Sendo dessa forma, existe um risco de se tratar uma alteração epitelial que não é causada pelo HPV (CAVALCANTI & CARESTIATO, 2006).

4.1.5 .4.3 Histopatologia

O exame histopatológico do colo uterino é aceito como padrão-ouro para o diagnóstico de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino (IARC, 2016). Sendo um procedimento de grande importância, e é nele que se baseia a maioria das decisões terapêuticas. Além de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HPV, o estudo histopatológico é capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (SOUZA, MELO & CASTRO, 2001).

As lesões neoplásicas invasivas do colo uterino são em geral precedidas por uma longa fase de doença pré-invasiva. Microscopicamente, isto se observa como uma gama de eventos que progridem da atipia celular a graus variados de displasia ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC) antes da progressão ao carcinoma invasivo (IARC, 2016).

O parecer sobre a presença de NIC em uma amostra tecidual cervical e o seu grau depende das características histológicas relativas a diferenciação, maturação e estratificação das células e anomalias nucleares. A proporção da espessura das células do epitélio com células maduras e diferenciadas é empregada na classificação da NIC. Graus mais graves de NIC têm maior probabilidade de apresentar uma maior proporção da espessura do epitélio composto de células indiferenciadas com apenas uma fina camada de células maduras e diferenciadas na superfície (IARC, 2016).

4.1.5 .4.4 Sistemas de genotipagem do HPV

É necessário o estabelecimento de métodos confiáveis para identificação dos vários tipos virais dada a diversidade dos genótipos dos mesmos e para tanto existem sistemas baseados em PCR com altíssima sensibilidade e especificidade e a análise dos produtos amplificados pode ser feita por diversas técnicas, entre elas, a hibridização com sondas,

hibridização reversa, digestão do DNA viral por enzimas de restrição (RFLP), sequenciamento direto do DNA, microarranjos de DNA (DNA *microarray*) e revelação por microfluorometria, além do método de detecção do RNAm viral das proteínas E6/E7 (CASTLE et al., 2007; YAMAGUSHI et al., 2002; SOTLAR et al., 2004; MOLIJN et al., 2005; LIE & KRISTENSEN, 2008; NOBRE et al., 2008).

4.1.5 .4.5 Método de detecção da expressão de E6/E7 RNAm

No genoma viral do HPV as proteínas E6 e E7 são oncogênicas e sua expressão precede e é essencial para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (MOLDEN et al., 2005; MOLDEN et al., 2006; JEANTET et al., 2009, RATNAM et al., 2010).

A amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos está disponível comercialmente nos testes PreTect HPV-Proofer (Norchip AS®, Klokkestua, Noruega) e NucliSENS EasyQ HPV (bioMérieux®S.A., Marcy l'Etoile, França). É uma reação de amplificação isotérmica (41°C), *multiplex* com detecção em tempo real, que utiliza as enzimas AMV-RT (Transcriptase Reversa do Vírus da Mieloblastose Aviária), a Rnase-H e a T7 RNA polimerase. Tem como alvo o RNAm de E6 e E7, é capaz de detectar de forma qualitativa através de oligonucleotídeos sintéticos (*beacons*) cinco genótipos de HPVs: 16, 18, 31, 33 e 45, que são os tipos mais prevalentes em carcinomas cervicais (LIE et al., 2005; MOLDEN et al., 2005; LIE & KRISTENSEN, 2008; JEANTET et al., 2009; HALFON et al., 2010; RATNAM et al., 2010).

O risco de desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC 2+), para aquelas mulheres que apresentaram expressão positiva para RNAm E6/E7 em um período de 2 anos, foi de 68,9 vezes. Em contrapartida, o risco foi de 5,7 vezes para as mulheres com resultado positivo para o DNA do HPV amplificado com iniciadores consenso (MOLDEN et al., 2006). A expressão de E6 e E7 parece ser melhor indicadora da infecção pelo HPV quando associada com o aumento do risco de progressão para neoplasia, do que somente a detecção do DNA do HPV, podendo ser um marcador molecular útil no *screening* do câncer cervical (MOLDEN et al., 2006; CASTLE et al., 2007; LIE & KRISTENSEN, 2008; DOCTER et al., 2009; HALFON et al., 2010).

Mais um método para a detecção do RNAm E6/E7, o HPV OncoTect (Incell DX, Menlo Park, California) foi desenvolvido na Universidade de Stanford (Califórnia, EUA). Ele

apresenta claras vantagens sobre outras técnicas de detecção do DNA do Vírus do Papiloma Humano (VPH), dado que identifica as infecções persistentes de qualquer tipo de VPH de alto risco oncogênico, e não as que desaparecem espontaneamente, de maneira que a especificidade e o valor de previsão positivo são superiores aos de outras técnicas de detecção de VPH, como visto na tabela 01 do estudo de Pierry e colaboradores (2012).

Tabela 01- Comparação de quantificação de RNAm de E6, E7 e Citologia anormal para a detecção de CIN2+ e histologia CIN 3+

Teste	Limite	Idade	Sens, %	Spec, %	PPV, %
Pap ± ASCUS	CIN 2+	≥30	89	8	16
Pap ± ASCUS	CIN 3+	≥30	100	10	6
Pap ± ASCUS	CIN 2+	<30	96	2	19
Pap ± ASCUS	CIN 3+	<30	93	2	10
E6 / E7 RNAm	CIN 2+	≥30	89	92	71
E6 / E7 RNAm	CIN 3+	≥30	100	82	24
E6 / E7 RNAm	CIN 2+	<30	88	88	64
E6 / E7 RNAm	CIN 3+	<30	92	81	36

Abreviaturas: ASCUS, células escamosas atípicas de significado indeterminado; CIN 2+, neoplasia intra-epitelial cervical (nível 2 ou superior); CIN 3+, neoplasia intra-epitelial cervical (nível 3 ou superior); E6 / E7 RNAm, resultados de testes de HPV E6/E7 RNAm em combinação com grau histológico como definido no limiar; Pap ± ASCUS, resultados da coloração de Papanicolaou são ASCUS em combinação com grau histológico como definido na categoria limite; PPV, valor preditivo positivo; Sens, sensibilidade do teste E6/ E7 RNAm em relação ao grau histológico; Spec, especificidade de teste de E6/E7 mRNA em comparação com o grau histológico.

O teste HPV OncoTect é uma análise de VPH baseada na detecção da sobre-expressão dos oncogenes E6 e E7. O teste consiste em uma hibridação *in situ* do RNAm das regiões E6 e E7 do vírus oncogênico e análise posterior mediante citometria de fluxo. Diferentemente de outras técnicas, o HPV OncoTect não destrói a célula, permitindo quantificar a percentagem de células que sobre-expressam as oncoproteínas E6 e E7.

6. CONCLUSÃO

Acredita-se que o estudo molecular da população acometida de lesões intraepiteliais cervicais servirá como base para uma implantação mais efetiva e direcionada das medidas educativas e preventivas sobre as patologias relacionadas ao trato genital feminino, incluindo o carcinoma cervical, que apresenta número de casos crescente na população. Servirá também como estímulo para o aumento de estudos na área e posterior acompanhamento da frequência e distribuição dos casos com base nos dados obtidos no presente estudo. Assim, será possível gerar um melhor conhecimento acerca da doença, possibilitando melhorias consequentes nas medidas de saúde adotadas sobre o tema.

REFERÊNCIAS

- ABREU, W. C. **Detecção de HPV e análise de marcadores imuno-histoquímicos em adenocarcinoma de colo uterino: Estudo da correlação com a resposta à radioterapia.** 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde)-Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.
- ALBUQUERQUE, K.M; FRIAS, P. G.; ANDRADE, C.L.T.; AQUINO, E.M.L.; MENEZES, G; SZWARCOWALD, C. L. Cobertura do teste de Papanicolau e fatores associados à não-realização: um olhar sobre o Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero em Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v. 25, supl 2, Rio de Janeiro, 2009.
- ALTIOK, S. Molecular markers in cervical cytology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 23, p. 709-728, 2003.
- ANJOS, S.J.S.B; VASCONCELOS, C. T. M.; FRANCO, E. S.; ALMEIDA, P. C.; PINHEIRO, A. K. B. Fatores de risco para o câncer de colo de útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. **Rev. esc. enferm. USP**, v. 44, n. 4, São Paulo, dez 2010.
- AYRES, A.R.G; SILVA, G.A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública**, vol.44, n.5, São Paulo, Outubro. 2010.
- BOSCH, F.X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A.R.; DE SANJOSE, S.; BRUNI, L.; TORTOLERO-LUNA, G.; KJAER, S. K.; MUNOZ, N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. **Vaccine**. v. 26 (Suppl 10), p. k1-16, 2008.
- BOSH, F.X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244-265, 2002.
- BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. **Clin Microbiol Rev**, v.16(1), p.1-17, 2003.
- CASTLE, P.E.; DOCKTLER, J.; GIACHETTI, C.; GARCIA, F. A.; McCORMICK, M.K.; MITCHELL, A.L.; HOLLADAY, E.B.; KOLK, D.P. A Cross-sectional Study of a Prototype Carcinogenic Human Papillomavirus E6/E7 Messenger RNA Assay for Detection of Cervical Precancer and Cancer **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2599-2605, 2007.
- CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F.N. Infecções Causadas Pelos Papilomavírus Humanos: Atualização Sobre Aspectos Viroológicos, Epidemiológicos e Diagnóstico – Review. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2006.
- DOCTER, J. ; SCHRODER, A.; HILL, C.; GUZENSKI, L.; MONSONEGO, J.; GIACHETTI C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, Suppl 1 (S55-S61), 2009.
- FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **Lancet Oncol**, v.3, p. 11-16, 2002.

GALLOWAY, D. Papillomavirus vaccines in clinical trials. **Lancet Infect Dis**, v. 3, p.469-75, 2003.

HALFON, P.; BENMOURA, D.; AGOSTINI, A.; KHIRI, H.; MARTINEAU, G.; PENARANDA, G.; BLANC, B. . Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ® HPV assay. **Journal of Clinical Virology**, n. 47, p. 177-181, 2010.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA; 2011. 104 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas**: recomendações para profissionais de saúde. 2. ed. Rio de Janeiro, 2006. 56 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (Lyon). **IARC handbooks of cancer prevention**: cervix cancer screening. Lyon: IARC Press, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chapter 2: An introduction to cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Disponível em: <http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=2>. Acesso em 20 de março de 2016.

JEANTET, D.; SCHWARZMANN, F.; TROMP, J. MELCHERS, W. J.; van der Wurff, A.A.; OOSTERLAKEN, T.; JACOBS, M.; TROESCH, A. NucliSENS EasyQ HPV v1 test Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v.45, S1 (S29 S37), 2009.

JO, H.; KIM, J.W. Implications of HPV infection in uterine cervical câncer - Review Article. **Cancer Therapy**, v. 3, p.419-434, 2005.

LIE, A. K.; KRISTENSEN, G. Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Testing as a Predictive Marker for Cervical Carcinoma. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 4, p. 405-415, 2008.

LIE, A. K.; RISBERG, B.; SANDSTAS, B.; SANDSTAD, B.; DELABIE, J.; RIMALA, R.; ONSRUD, M. THORESEN, S. DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. **Gynecologic Oncology**, n. 97, p. 908–915, 2005.

LIMA, C.A.; PALMEIRA, J.A.V.; CIPOLLOTTI, R. Fatores associados ao câncer do colo uterino em Proorriá, Sergipe, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n.10, Rio de Janeiro, out. 2006.

MARTINS, L.F.L.; THULER, L.C.S.; VALENTE, J.G. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 27(8), p.485-492, 2005.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer [homepage da Internet]. Câncer do colo do útero. Disponível em: [http:// www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326). Acesso em 27 de mai de 2015.

MOLDEN, T.; KRAUS, I.; SKOMEDAL, H.; HAGMAR, B. Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. **Gynecologic Oncology**, v. 100, p. 95 – 100, 2006.

MOLDEN, T.; NYGARD, J. F.; KRAUS, I.; KARLSEN, F.; NYGARD, M.; SKARE, G. B.; SKOMEDAL, H.; THORESEN, S. O.; HAGMAR, B. Predicting CIN2 when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-Proofer and consensus PCR: a 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. **International Journal of Cancer**, v. 114, p. 973–976, 2005.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; van DOOM, L. J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MONSONEGO, J.; HUDGENS, M. G.; ZERAT, J. C.; SYRJANEN, K.; HALFON, P.; RUIZ, F. SMITH, J. S. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid based cytology in primary cervical cancer screening (the fase study). **International Journal of Cancer**, 2011.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 550-560, 2010.

MOSCICKI, A.B.; HILLS, N.; SHIBOSKI, S.; POWELL, K.; JAY, N.; HANSON, E.; MILLER, S.; CLAYTON, L.; FARHAT, S.; BROERING, J.; DARRAGH, T.; PALEFSKY. Risks for incident human papillomavirus infection and lowgrade squamous intraepithelial lesion development in young females. **J Am Med Assoc**, v. 285, p. 2995-3002, 2001.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res**, v.89(2), p. 213-28, 2002.

MUNOZ, N.; BOSCH, F.X.; SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **N Engl J Med**, 348:518-27, 2003.

MUÑOZ, N.; MÉNDEZ, F.; POSSO, H.; MOLANO, M.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; RONDEROS, M.; MEIJER, C.; MUÑOZ, A. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. **J Infect Dis** v. 190, p. 2077-87, 2004.

NAKAGAWA, J.T.T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Rev. Bras. Enferm.**, vol 63, n.2, Brasília, Março. 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP, 1988, Bethesda. The 1988 Bethesda System for reporting cervical: vaginal cytological diagnoses. **JAMA**, v. 262, n. 7, p. 931-34, 1989.

NELSON, J. H.; GREGORY, A. H.; EDLUND, K.; EVANDER, M.; KJELLBERG, L.; WADELL, G.; DILLNER, J.; GERASIMOVA, T.; COKER, A. L.; PIRISI, L.; PETEREIT, D.; LAMBERT, P. F. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomavirus in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 688-695, 2000.

NOBRE, R. J.; ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p. 13-21, 2008.

PEDROSA, M. L. **Perfil epidemiológico de mulheres portadoras de atipias escamosas de significado indeterminado atendidas pelo programa de controle do câncer de colo uterino no município do Rio de Janeiro**. 2003. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Saúde Pública)-Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

PIERT, D.; WESS, G.; LACK, B.; CHEN, V.; FUSCO, J. Intracellular Human Papillomavirus E6, E7 mRNA quantification predicts CIN 2+ in Cervical biopsies better than Papanicolaou screening for women regardless of age. **Arch Pathol Lab Med**, v. 136, p. 956-960, 2012.

RATNAM, S.; COUTLEE, F.; FONTAINE, D.; BENTLEY, J.; ESCOTT, N.; GHATAGE, P.; GADAG, V.; HOLLOWAY, G.; BARTELLAS, E.; KUM, N.; GIEDE, C.; LEAR, A. Clinical Performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 Mrna Assay in Comparison with That of the Hybrid Capture 2 Test for Identification of Women at Risk of Cervical Cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2779–2785, 2010.

RICHARDSON, H.; KELSALL, G.; TELLIER, P.; VOYER, H.; ABRAHAMOWICZ, M.; FERENCZY, A.; COUTLÉE, F.; FRANCO, E. L. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. **Biomarkers Prev** v. 12, p. 485-90, 2003.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L. R.; ROSA, D. D.; BOZZETI, M. C.; SILVA, F. R. SILVA, B. R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n.5, Rio de Janeiro, Maio 2009.

SASLOW, D. et al. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, p. 342-362, 2002.

SOLOMON, D.; NAYAR R.; **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal: definições, critérios e notas explicativas**. 2^a ed. Ed. Reinventer Editora Ltda. Rio de Janeiro-RJ. 2005

SOTLAR, K.; DIEMER, D.; DETHLEFFS, A.; HACK, Y.; STUBNER, A.; VOLLMER, N.; MENTON, S.; MENTON, M.; DIETZ, K.; WALLWIENER, D.; KANDOLF, R.; BULTMANN, B. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3176-3184, 2004.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

STEBEN, M.; FRANCO, E.D. Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology**, v. 107, S2-S5, 2007.

The 1988 Bethesda System for reporting cervical/ vaginal cytological diagnosis. National Cancer Institute Workshop. **JAMA**. v. 262(7), p. 931-4, 1989.

VILLA, L.L. Biology of genital human papillomaviruses. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v.94, Suppl 1 (S3-S7), 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 10/03/2016.

WRIGHT, T. C; COX, J. T.; MASSAD, L. S.; TWIGGS, L. B.; WILKINSON, E.J.; ASCCP-Sponsored Consensus Conference. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. **JAMA**, v. 287, n. 16, p. 2120-2129, 2002.

YAMAGUSHI, A.; HASHIMOTO, N.; TSUTAE, W.; SEINO, K.; EBINA, Y.; TOKINO, T.; SATO, N.; KIKUCHI, K. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluometry for screening of cervical cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 41-49, 2002.

zur HAUSEN, H. Papillomavirus and câncer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 342-350, 2002.