

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Curso de Biomedicina**

**Paloma Bertaglia Pinto**

**FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS E BIOMOLECULARES PARA  
RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

**São Paulo**

**2019**

**Paloma Bertaglia Pinto**

**FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS E BIOMOLECULARES PARA  
RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Biomedicina do  
Centro Universitário São Camilo,  
orientado pela Profa. Dra. Carolina Nigro  
Stella, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

**São Paulo**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani**

Pinto, Paloma Bertaglia

Ferramentas morfológicas e biomoleculares para rastreamento do câncer do colo do útero / Paloma Bertaglia Pinto. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

42 p.

Orientação de Carolina Nigro Stella.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Colposcopia 2. Hibridização in situ 3. Imuno-histoquímica 4. Neoplasias do colo do útero 5. Papillomaviridae I. Stella, Carolina Nigro II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 574.8

**Paloma Bertaglia Pinto**

**FERRAMENTAS MORFOLÓGICAS E BIOMOLECULARES PARA  
RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**

**São Paulo, 18 de novembro de 2019**

---

Professor Orientador

---

Professor Examinador

---

Professor Examinador

PINTO, Paloma Bertaglia. **Ferramentas morfológicas e biomoleculares para rastreamento do câncer do colo do útero**. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

O câncer do colo do útero é uma doença de evolução lenta e progressiva que acomete, sobretudo, mulheres acima dos 25 anos. O principal fator etiológico relacionado ao desenvolvimento desta neoplasia é a infecção persistente por genótipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV), considerado o agente infeccioso de transmissão sexual mais comum. O vírus não cresce em cultura de células convencional, e os métodos sorológicos não são eficazes no diagnóstico, pois nem sempre há soroconversão. O diagnóstico do câncer do colo do útero baseia-se no rastreamento e na detecção precoce das lesões precursoras (lesões intraepiteliais/neoplasias intraepiteliais) que, quando diagnosticadas em seus estágios iniciais, apresentam de 60 a 90% de chances de cura. Os principais métodos para detecção das lesões são as ferramentas morfológicas: colpocitologia convencional, colposcopia e biópsia, considerada padrão-ouro. Ferramentas moleculares, tais como: imunohistoquímica (IHQ), imunocitoquímica (ICQ), hibridização *in situ* (HIS), hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), hibridização *in situ* cromogênica (CISH), captura híbrida (CH), reação em cadeia da polimerase (PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) apresentam melhor sensibilidade e especificidade, além de apresentarem valor prognóstico, porém ainda dependem de colposcopia e biópsia para definir a melhor abordagem terapêutica e o custo pode representar um obstáculo à sua implementação no país. Dessa forma, podemos concluir que, a aplicação de métodos morfológicos em pacientes assintomáticas, com objetivo de identificar lesões precursoras sugestivas do carcinoma, é uma boa ferramenta de rastreamento, enquanto o acompanhamento e tratamento de pacientes com lesões intraepiteliais podem ser complementados através de técnicas moleculares disponíveis no mercado.

**Palavras-chave:** 1. Colposcopia 2. Hibridização *in situ* 3. Imuno-histoquímica 4. Neoplasias do colo do útero 5. Papillomaviridae.

PINTO, Paloma Bertaglia. **Ferramentas morfológicas e biomoleculares para rastreamento do câncer do colo do útero**. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2019.

The Cervix Cancer is a disease of slow and progressive evolution that affects, most of all, women above 25 years old. The main etiological factor related to the development of this kind of cancer is the persistent infection by high risk genotypes of the Human Papillomavirus (HPV), considered the most common sexually transmitted infectious agent. The virus doesn't grow in conventional cultured cells technique and the serological methods aren't effective once the HPV does not circle in the blood of infected individuals. The diagnostic of cervix cancer is based on precocious tracking and detection of precursory injuries (intraepithelial lesions/intraepithelial neoplasms) witch when detected in its early stages presents 60 to 90% chances of cure. The main methods commonly used for cervix lesions detection are the morphological tools: conventional colpocytology, colposcopy examination and biopsy, which is considered the gold standard. Molecular tools, such as: immunohistochemistry (IHC), immunocytochemistry (ICQ), in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH), polymerase chain reaction (PCR) and real time polymerase chain reaction (qPCR), present a way better sensibility and specificity than the morphological tools and also present prognostic value. However, these molecular tools are still dependents of colposcopy and biopsy to define the better therapeutic approach, and the cost could potentially represent a great obstacle in its implementation in the country. Thus, we can conclude that the application of morphological methods in asymptomatic patients, with the objective for identification of precursory injuries that suggests carcinoma, are a decent and good tool for tracking, while the follow up and treatment of patients with intraepithelial lesions can be enhanced through molecular tools available in the market.

Keywords: 1. Colposcopy 2. In situ hybridization 3. Immunohistochemistry 4. Cervical neoplasms 5. Papillomaviridae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV. L (Late) – genes que se expressam tardiamente no ciclo vital do vírus. E (Early) – genes que se expressam precocemente no ciclo vital do vírus. URR (Upstream Regulatory Region). .....	15
Figura 2– Papilomavírus Humano: biologia viral e carcinogênese .....	16
Figura 3– Colheita do colo uterino.....	18
Figura 4– Efeitos citopáticos provocados pelo HPV– A) Presença de coilócitos típicos e células escamosas intermediárias e superficiais normais (obj. 40x) B) Presença de células parabasais ou basais aglomeradas e isoladas, com aumento nuclear (elevada relação núcleo-citoplasma).....	19
Figura 5- Comparação entre esfregaços de colpocitologia convencional (A) e colpocitologia em meio líquido (B).....	21
Figura 6- Esquematização do método automatizado ThinPrep Pap .....	22
Figura 7- Esquematização do método automatizado SurePath. ....	23
Figura 8- Colposcopia .....	24
Figura 9– Histologia normal do colo uterino .....	25
Figura 10– Evolução das lesões NIC .....	26
Figura 13– Reação por hibridização in situ. ....	30

## LISTA DE SIGLAS

HPV	Papilomavírus Humano
IHQ	Imunohistoquímica
ISH	Hibridização in situ
CH	Captura híbrida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
NICs	Neoplasias intraepiteliais cervicais
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>URR</i>	<i>Upstream Regulatory Region</i>
<i>L</i>	<i>Late</i>
<i>E</i>	<i>Early</i>
HR-HPV	Genótipos de alto risco do HPV
pRB	Proteína do Retinoblastoma
E2F	Fator de transcrição
P16INK4a	Proteína supressora tumoral
P53	Proteína 53
OMS	Organização Mundial da Saúde
JEC	Junção Escamo-Colunar
PEG	Polietileno glicol
CML	Citologia em meio líquido

FDA Food and Drug Administration

NIC 1 Neoplasia intraepitelial classe 1

NIC 2 Neoplasia intraepitelial classe 2

NIC 3 Neoplasia intraepitelial classe 3

IARC INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER

KI-67 Proteína marcadora de proliferação celular

DNA Ácido desoxirribonucleico

RNA ácido ribonucleico

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 OBJETIVO.....	11
3 METODOLOGIA.....	12
4 DESENVOLVIMENTO.....	13
4.1 HPV e o câncer do colo do útero.....	14
4.2 Rastreamento e diagnóstico .....	17
4.2.1 Colpocitologia convencional .....	18
4.2.2 Citologia em meio líquido .....	20
4.2.3 Colposcopia.....	23
4.2.4 Biópsia.....	25
4.2.5 Imunohistoquímica e imunocitoquímica.....	27
4.2.6 Hibridização <i>in situ</i> .....	29
4.2.6 Captura híbrida.....	31
4.2.7 Reação em cadeia polimerase .....	32
5. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é considerado um problema de saúde pública global, com uma estimativa de mais de 265 mil mortes no mundo, sendo 80% dos casos diagnosticados em países subdesenvolvidos. No Brasil, este é o terceiro tipo de neoplasia mais incidente na população feminina (excetuando os casos de câncer de pele não melanoma) (DORBAR et al., 2016; INCA, 2017).

A doença está frequentemente associada à infecção persistente por genótipos de alto risco do Papilomavírus Humano (HPV). O vírus é considerado o agente infeccioso de transmissão sexual mais comum, e tem sido evidenciado na literatura como causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento do carcinoma (MELO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016). Outros cofatores de risco podem ser: imunossupressão, história de infecções sexualmente transmitidas, idade e baixa condição socioeconômica (MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 2002).

Contudo, a maioria dos casos pode ser evitado através de métodos de rastreamento que permitem detectar o câncer em estágios iniciais (lesões intraepiteliais do colo uterino), prevenindo sua potencial progressão para carcinoma. O principal teste aplicado à rastreabilidade das lesões é a colpocitologia convencional ou teste de Papanicolaou, seguido de colposcopia e biópsia/histologia. Testes biomoleculares, como a imunohistoquímica (IHQ), hibridização *in situ* (ISH), captura híbrida (CH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser utilizados para detecção viral em esfregaços colpocitológicos ou achados histopatológicos (DAMACENA et al., 2017; MITTRLDORF et al., 2016).

A colpocitologia é uma técnica baseada em critérios por vezes subjetivos, que podem gerar discordâncias entre os observadores, porém é um método barato e com sensibilidade e especificidade aceitáveis para o rastreio de lesões intraepiteliais do colo uterino. A análise histopatológica da biópsia, é considerada padrão ouro no diagnóstico do câncer do colo do útero. Técnicas biomoleculares aplicadas ao diagnóstico da infecção viral dispõem de melhor sensibilidade e especificidade, contudo apresentam elevado custo (MITTRLDORF et al., 2016).

## **2 OBJETIVO**

O presente estudo tem como objetivo discutir as técnicas morfológicas e biomoleculares disponíveis no mercado, no que se refere à tecnologia utilizada e sua aplicação enquanto ferramenta de prevenção/diagnóstico do câncer do colo do útero.

### **3 METODOLOGIA**

Foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados PubMed, Google Acadêmico e no portal eletrônico *Scientific Eletronic Libary On-Line* (SciELO), utilizando-se das palavras chave: Papanicolaou, HPV, colposcopia, câncer do colo do útero, hibridização in situ, imunohistoquímica, PCR.

O levantamento bibliográfico incluiu artigos da língua inglesa, portuguesa e espanhola a partir do ano de 2002 até 2019.

#### 4 DESENVOLVIMENTO

O câncer do colo do útero caracteriza-se por uma replicação desordenada das células de revestimento do epitélio do órgão, com potencial para comprometer o estroma, invadir estruturas e órgãos próximos. A doença apresenta desenvolvimento lento e silencioso na sua fase inicial, sendo precedida por lesões intraepiteliais cervicais ou também denominadas histologicamente de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), que quando diagnosticadas em estágio iniciais, normalmente (70%) regredem espontaneamente em menos de um ano (MITTRLDORF *et al.*, 2016; DAMACENA, 2017).

De acordo com o tipo de epitélio comprometido, o câncer do colo do útero pode ser classificado em: carcinoma epidermóide, que acomete o epitélio escamoso, sendo o mais incidente (representa cerca de 80% dos casos) e o adenocarcinoma, tipo mais raro que acomete o epitélio glandular (20% dos casos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A incidência da doença inicia na faixa etária dos 25 aos 29 anos e o risco aumenta gradativamente com a idade até atingir o pico etário entre 45 a 50 anos. Segundo as novas estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Tabela 1), para o biênio 2018-2019 são estimados 16.370 casos novos casos, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres.

**Tabela 1 Estimativa para o biênio 2018-2019 dos dez tipos de câncer incidentes em mulheres, no Brasil (exceto câncer de pele não melanoma).**

<b>Localização primária</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
Mama Feminina	59.700	29,5
Cólon e Reto	18.980	9,4
<b>Colo do Útero</b>	<b>16.370</b>	<b>8,1</b>
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2

<i>Glândula Tireoide</i>	8.040	4,0
<i>Estômago</i>	7.750	3,8
<i>Corpo do útero</i>	6.600	3,3
<i>Ovário</i>	6.150	3,0
<i>Sistema Nervoso Central</i>	5.510	2,7
<i>Leucemias</i>	4.860	2,4

Fonte: Adaptado de (INCA, 2017).

#### 4.1 HPV e o câncer do colo do útero

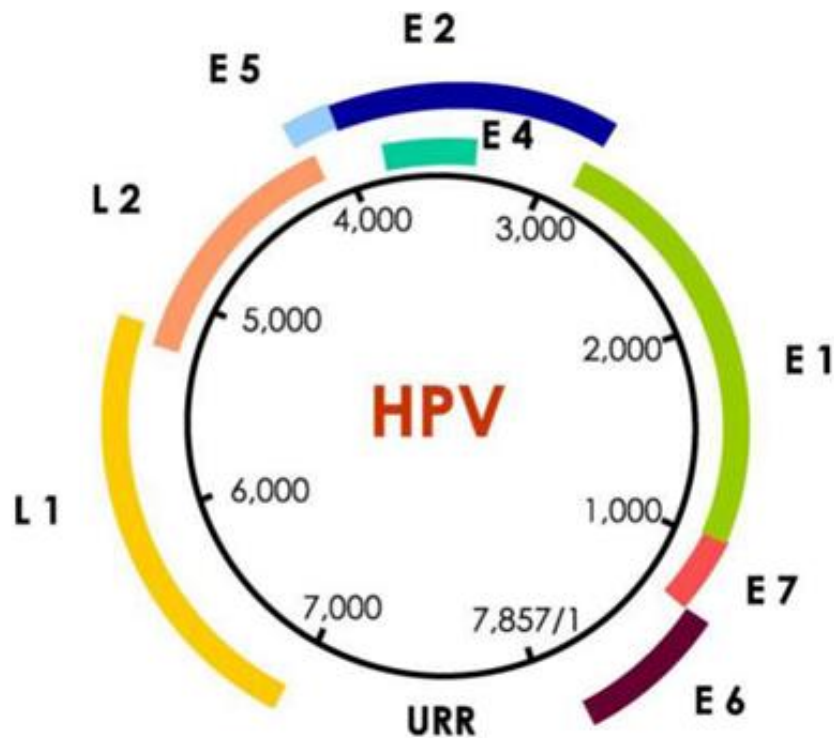
A infecção persistente por genótipos de alto risco do HPV é o principal fator etiológico associado à progressão da doença, observa-se relação causal em 100% dos casos. A partir da introdução de técnicas biomoleculares mais de 200 tipos virais já foram identificados, dos quais 40 infectam o trato genital. Os principais genótipos detectados em carcinomas do colo do útero são o HPV18 e o HPV16, responsáveis por aproximadamente 55% a 60% de todos casos (INCA, 2017).

Os HPVs são pequenos vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) dupla fita (50-55nm) pertencentes à família *Papillomaviridae* – gênero *Papillomavirus*. Trata-se de um vírus não envelopado, com simetria icosaédrica. Apresenta um genoma de aproximadamente 8.000 pares de bases (8Kb) de DNA dupla fita circular, associado a proteínas semelhantes a histonas, envolto por 72 capsômeros constituídos por duas proteínas estruturais, L1 e L2 (MACLACHLAN et al., 2017).

Seu genoma circular (Figura 1) é constituído por oito sequências codificantes denominadas de “*open reading frames*” (ORFs), apresentando seis genes que se expressam precocemente (E1, E2, E4, E5, E6, e E7) necessários à replicação viral e com propriedades de transformação oncogênica e dois genes que se expressam tardiamente (L1 e L2) que codificam duas proteínas estruturais, as proteínas L1 e L2

do capsídio viral, além de uma região reguladora *URR* (*Upstream Regulatory Region*) onde se encontram sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral (GRAHAM, 2010).

**Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV. L (Late) – genes que se expressam tardiamente no ciclo vital do vírus. E (Early) – genes que se expressam precocemente no ciclo vital do vírus. URR (Upstream Regulatory Region).**



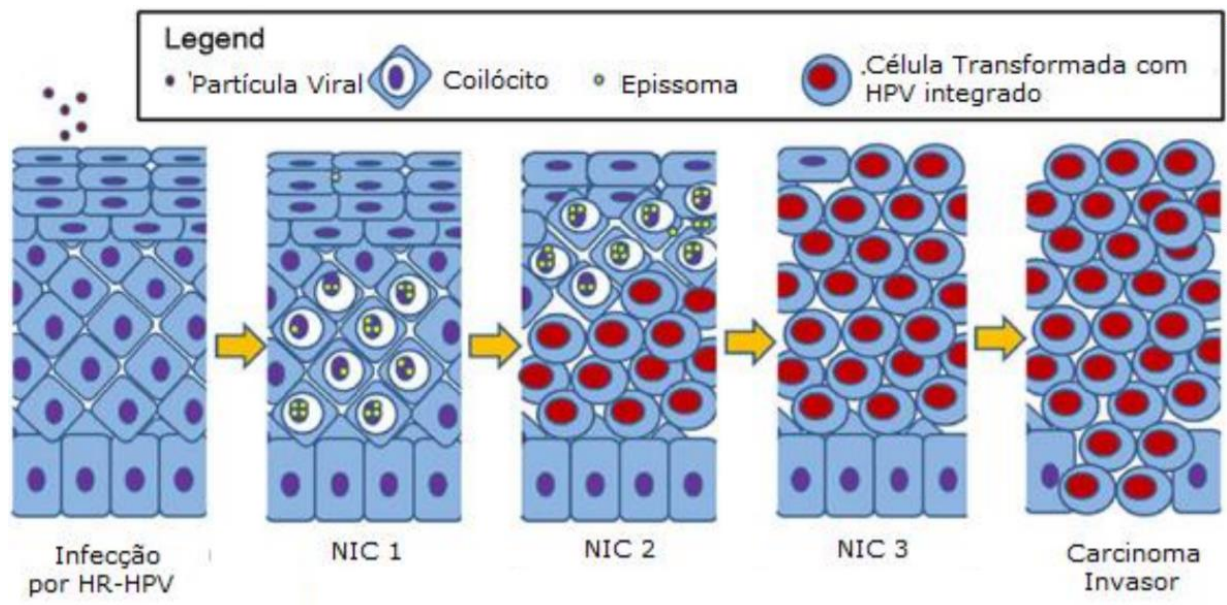
Fonte: (MUÑOZ *et al.*, 2006).

O processo infeccioso inicia-se com o acesso das partículas virais às células basais do epitélio escamoso do colo uterino. A entrada da partícula viral na célula hospedeira se inicia com a interação da porção terminal da proteína L1 aos receptores presentes na superfície celular, como a integrina  $\alpha$ -seis e  $\beta$ -quatro. O vírus é internalizado através de mecanismos de endocitose, processo que pode ocorrer lentamente. Inicialmente, acredita-se que o HPV mantenha seu genoma com um baixo número de cópias, sob a forma episossomal. Os genes virais são expressos conforme o processo de diferenciação das células infectadas (FERRAZ, 2012; SHAH *et al.*, 2016).

As proteínas então codificadas pelos genes precoces serão expressas em menor concentração nas células basais do epitélio, garantindo dessa forma a evasão do sistema imune e a manutenção da replicação viral. As proteínas E6 e E7 são responsáveis pela síntese de DNA nas células das camadas suprabasais do epitélio, levando a célula infectada a progredir no ciclo celular. Nas camadas mais superficiais do epitélio são expressas as proteínas estruturais L1 e L2, que através da maquinaria celular, formam partículas virais maduras, que posteriormente são liberadas durante a descamação celular (LETO, 2011)

O processo de desenvolvimento de neoplasias está relacionado à perda da regulação do ciclo normal do HPV com integração do genoma viral ao da célula hospedeira, em infecções persistentes por genótipos de alto risco do HPV (*HR-HPV*) (Figura 2) (FERRAZ, 2012; SHAH et al., 2016).

**Figura 2– Papilomavírus Humano: biologia viral e carcinogênese**



Fonte: (SHAH et al., 2016).

A integração do genoma viral resulta no aumento de expressão dos oncogenes E6 e E7, que inativam proteínas humanas as quais regulam o ciclo celular e são codificadas por genes supressores de tumor. O oncogene E7 inibe a atividade da proteína do Retinoblastoma (pRB), responsável pela manutenção das células na fase G1 do ciclo celular, cuja função consiste na formação de complexos estáveis com o

fator de transcrição E2F, que quando livre, inicia a transcrição do genoma. Por consequência, a inativação da pRB resulta no aumento da proliferação celular no epitélio infectado (FERRAZ, 2012; SHAH et al., 2016).

A proteína supressora tumoral (p16INK4) é responsável por manter a pRB ativa e ligada ao E2F e sua expressão é controlada por um feedback negativo exercido pela pRB. A inativação da pRB pelo HPV resultará no aumento de expressão da p16INK4 pelas células infectadas, na tentativa de controlar o ciclo celular irregular. A oncoproteína E7 também é capaz de se ligar à proteína 21/proteína 27, impedindo desta forma o controle do ciclo celular em diversos pontos de checagem (FERRAZ, 2012; SHAH et al., 2016).

Através da oncoproteína E6, o HPV modifica a proteína 53 e a marca para destruição pelo sistema ubiquitina-proteassomo, interferindo no controle do ciclo celular. A p53, também denominada “guardiã do genoma”, pode interromper o ciclo celular em resposta à um dano ao DNA da célula. A degradação da p53 afeta a integridade do DNA replicado, provocando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo desenvolvimento da neoplasia (FERRAZ, 2012; SHAH et al., 2016).

## **4.2 Rastreo e diagnóstico**

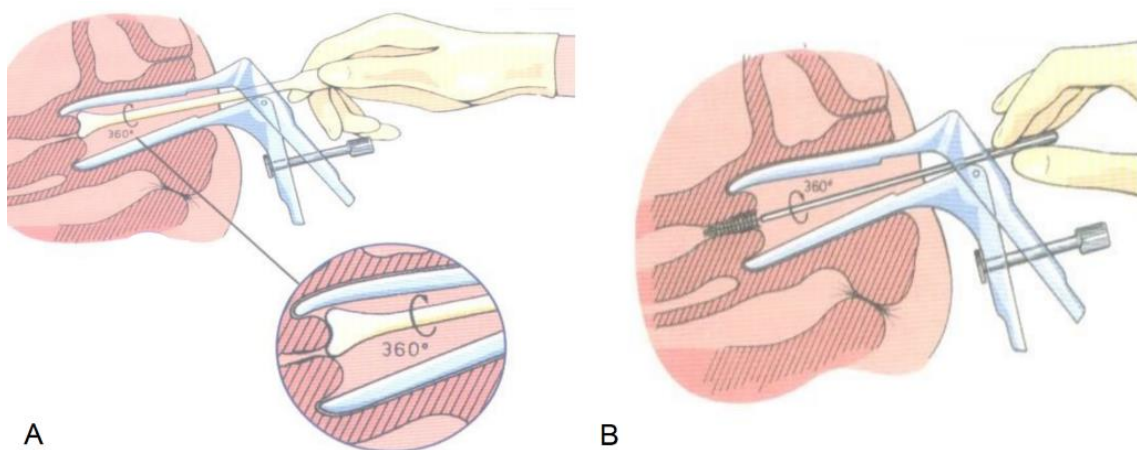
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma estratégia efetiva para a detecção precoce da doença seria a aplicação de um exame em pacientes assintomáticos, com objetivo de identificar lesões precursoras sugestivas do carcinoma e assim encaminhá-las para investigação e tratamento adequado, reduzindo, em média, de 60% a 90% a incidência do câncer. O exame aplicado à rastreabilidade e diagnóstico destas lesões deve ser seguro, financeiramente aceitável pelas mulheres, ter sensibilidade e especificidade comprovadas com boa relação custo-efetividade (INCA, 2017).

### 4.2.1 Colpocitologia convencional

A colpocitologia convencional, apresentada em 1943 por Papanicolaou e Traut, é ainda hoje a técnica mais utilizada para a detecção de lesões precursoras e do câncer do colo do útero. O exame é indicado como um método de rastreamento que tem como princípio a avaliação de alterações morfológicas nucleares em células colhidas do colo uterino (BRINGHENTI et al., 2010).

As amostras colpocitológicas são colhidas da ectocérvice e da endocérvice, sob controle visual, com o auxílio de um espéculo vaginal (Figura 3). O material colhido é distribuído na lâmina de maneira delicada e rápida, a fim de confeccionar esfregaços finos e uniformes. O fixador utilizado no método convencional é o etanol 95% ou solução alcoólica contendo polietileno glicol (PEG). Os espécimes clínicos são corados de acordo com a técnica de Papanicolaou, que consiste na utilização de um corante nuclear (Hematoxilina) e dois corantes citoplasmáticos (Orange G e EA36) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; LIMA et al., 2012).

**Figura 3– Colheita do colo uterino**

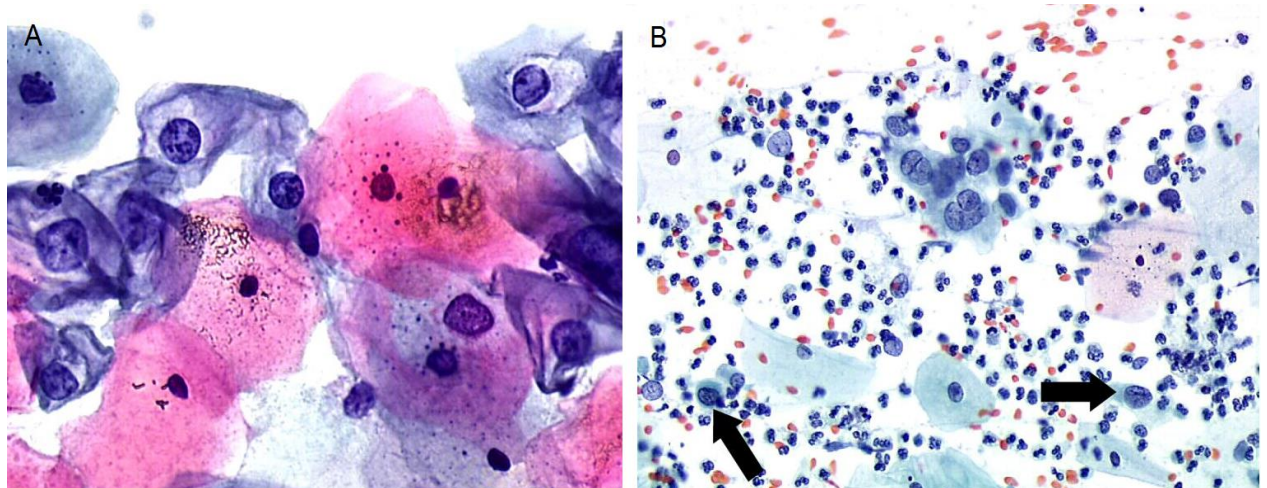


Fonte: Adaptado de (INCA, 2016).

O exame não identifica o vírus, mas sim efeitos citopáticos provocados pela infecção viral (Figura 4). O núcleo de uma célula sob efeito do HPV pode apresentar

variações de tamanho (anisocariose), multinucleação, carioteca irregular e cromatina graulosa. A coilocitose, caracterizada pela presença de uma cavidade citoplasmática perinuclear clara, é considerada um efeito citopático característico da infecção pelo HPV em células maduras. Em casos de carcinoma invasor é possível avaliar o aumento e a variação do tamanho do nucléolo. O citoplasma de células malignas geralmente não aumenta na mesma proporção que o núcleo, dessa forma, o aumento na relação núcleo/citoplasma é considerado um critério de malignidade (LIMA, 2012).

**Figura 4– Efeitos citopáticos provocados pelo HPV– A) Presença de coilócitos típicos e células escamosas intermediárias e superficiais normais (obj. 40x) B) Presença de células parabasais ou basais aglomeradas e isoladas, com aumento nuclear (elevada relação núcleo-citoplasma).**



Fonte: Adaptado de (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER –IARC).

A colpocitologia convencional apresenta sensibilidade de 58%, com especificidade de 68% (STABILE et al., 2012). Sua sensibilidade para detectar lesões de alto grau num único exame é relativamente baixa, com número de falso-negativos que variam de 20 a 40%. As vantagens do teste são: baixo custo, simplicidade técnica, além de ser um exame rápido e não invasivo, tendo uma boa relação custo benefício. Contudo, algumas limitações devem ser evidenciadas como a subjetividade na interpretação das amostras e a impossibilidade de assegurar invasão ou extensão da invasão no caso de lesões malignas (LIMA, 2012; BRINGHENTI, 2010).

O exame colpocitológico periódico tem sido a estratégia de saúde pública no Brasil para prevenção, baseando-se no fato de que esta neoplasia é precedida por

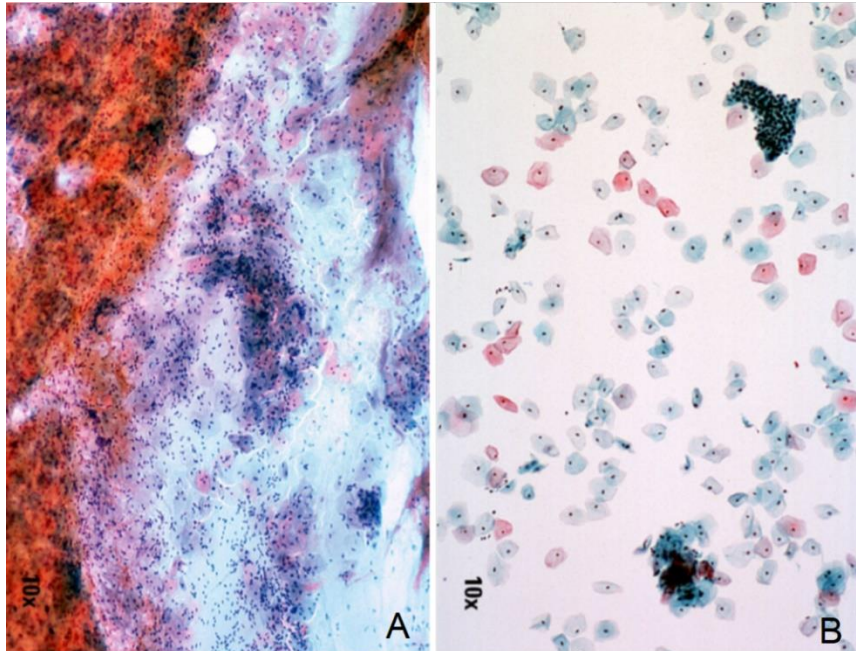
lesões intraepiteliais de progressão lenta, que podem ser diagnosticadas e tratadas antes de se tornarem invasivas. Segundo a OMS, uma cobertura da população-alvo de, no mínimo, 80% e a garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados é possível reduzir, em média, de 60 a 90% a incidência do câncer do colo do útero (INCA, 2016).

#### **4.2.2 Citologia em meio líquido**

A citologia de meio líquido (CML) é um método de preparação de amostras de células, introduzido e aprovado desde 1996 pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, dos Estados Unidos. A técnica foi desenvolvida com intuito de melhorar a sensibilidade e especificidade da colpocitologia convencional, reduzindo a proporção de amostras inadequadas para estudo colpocitológico. Sua utilização no Brasil ainda é limitada devido ao maior custo em relação ao método convencional (STABILE et al., 2012).

O procedimento técnico consiste na colheita e suspensão da amostra citológica em um líquido conservante. Através de sistemas automatizados ou semiautomatizados, é possível confeccionar lâminas de microscopia com distribuição homogênea e fina das células colhidas. As lâminas de microscopia apresentam fundo mais limpo (Figura 5), sem superposições de células e obscurecimento por outros elementos, o que se deve a sistemas de remoção de artefatos através de filtração, centrifugação ou outro sistema de processamento a depender do fabricante do kit (STABILE et al., 2012; LIMA et al., 2012).

**Figura 5- Comparação entre esfregaços de colpocitologia convencional (A) e colpocitologia em meio líquido (B)**

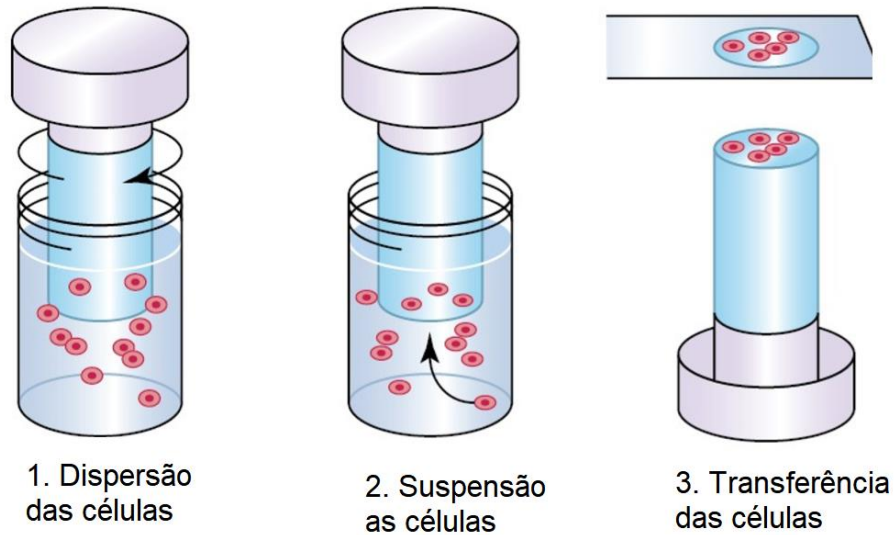


Fonte: Adaptado de (HOLOGIC, 2011).

As vantagens da CML são a presença de 100% do material coletado no líquido conservante, com a possibilidade de testes moleculares e a repetição de novos exames para análise citológica sem necessidade de nova colheita, além da redução de resultados falso-negativos e de esfregaços insatisfatórios. O teste, quando combinado com a colposcopia e biópsia, apresenta sensibilidade de 66,7% e 86 a 100% de especificidade (STABILE et al., 2012; COLONELLI, 2014). A principal desvantagem da técnica é o custo dos equipamentos e reagentes, além da necessidade de adaptação dos profissionais envolvidos à nova técnica (LIMA et al., 2012).

No sistema *ThinPrep* (Hologic, Inc., Marlborough, MA) (Figura 6) os espécimes clínicos são processados em um sistema automatizado, e é através do movimento de rotação do filtro que os detritos e muco da amostra são separados. As células epiteliais permanecem aderidas ao filtro enquanto o fluído é descartado. O filtro é então invertido e ligeiramente pressionado contra a lâmina de microscopia, resultando numa distribuição homogênea em monocamada das células numa área circular definida (HOLOGIC, 2018; LIMA et al., 2012).

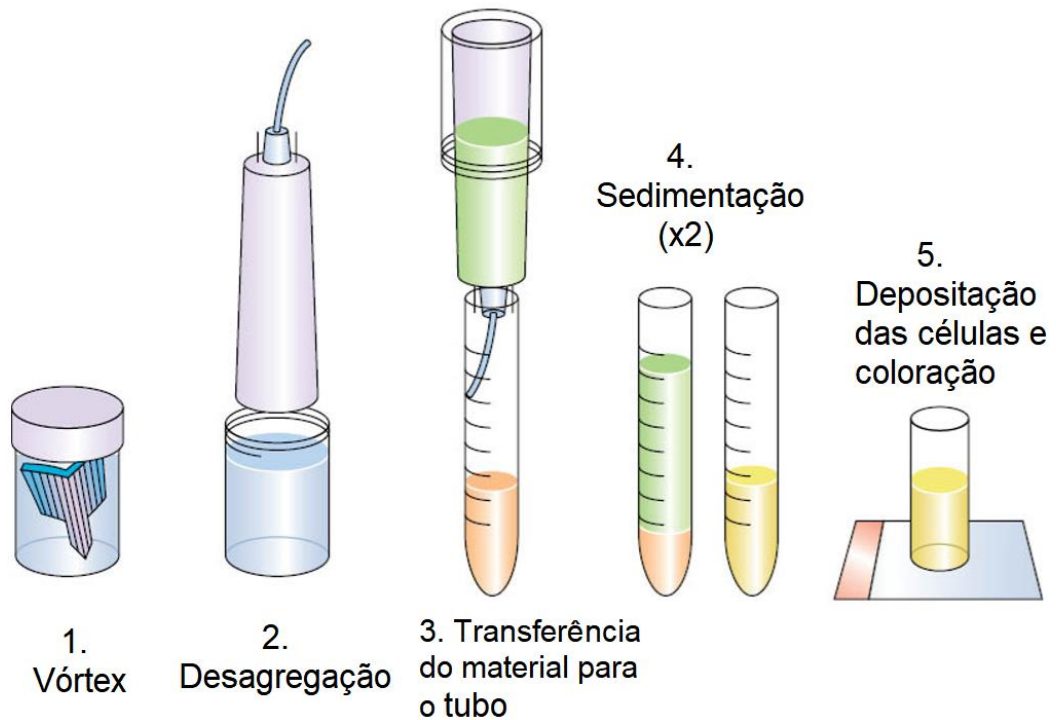
**Figura 6- Esquemática do método automatizado ThinPrep Pap**



Fonte: Adaptado de (CIBAS, 2009).

No sistema *SurePath* (BD, Franklin Lakes, NJ), as amostras passam pelo vórtex, o qual promove a desagregação celular, sendo posteriormente transferidas para os tubos contendo o reagente de densidade. Todo conteúdo é então centrifugado duas vezes. A primeira centrifugação permite a separação dos elementos celulares (pellete) do reagente de densidade (sobrenadante), o qual será aspirado e o material centrifugado novamente. Por fim, o pellet formado é depositado na lâmina de vidro e corado (Figura 7) (CIBAS, 2009; LIMA et al., 2012).

**Figura 7- Esquemática do método automatizado SurePath.**

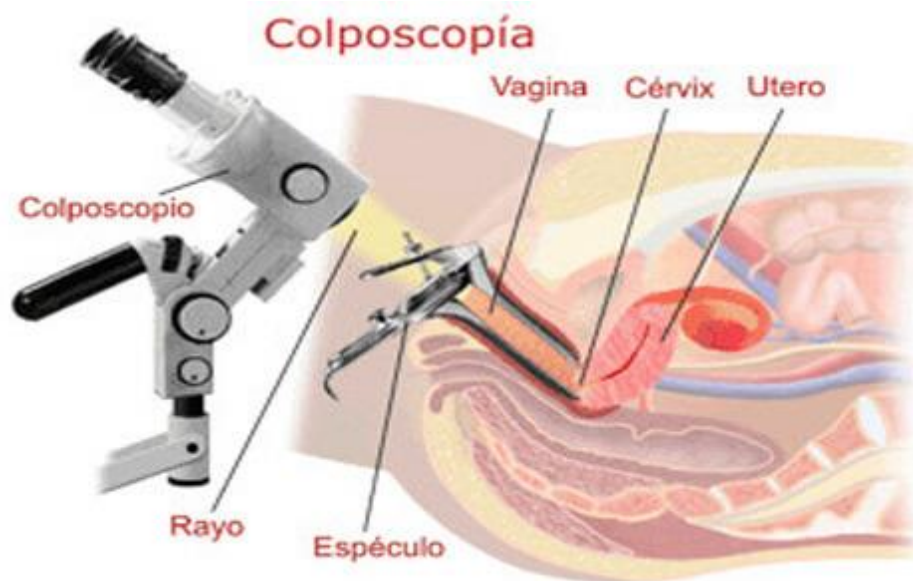


Fonte: Adaptado de (CIBAS, 2009).

### 4.2.3 Colposcopia

A colposcopia é um exame visual realizado através de lupa, que permite a visualização do colo uterino (avaliação de alterações vasculares), vagina e dos lábios vaginais externos com aumento de até 40 vezes (Figura 8). O exame é realizado após a limpeza do colo e fórnices vaginais com soro fisiológico a 0,9%. Após avaliação visual, aplica-se a solução de ácido acético a 5% e lugol (Teste de Schiller) em passos sucessivos. O teste apresenta sensibilidade de 80% e especificidade de 48%, os índices de falso-positividade são de 10 a 15% (STOFLEER et al., 2011).

**Figura 8- Colposcopia**



Fonte: (BRITO, 2011).

A aplicação do ácido acético provoca a precipitação de proteínas nucleares em um processo de coagulação reversível, ocasionando assim o acetobranqueamento. O efeito do ácido acético depende da relação núcleo/citoplasma das células presentes na superfície do epitélio. As áreas de neoplasia apresentam coagulação máxima, em comparação ao epitélio normal, devido ao número de células indiferenciadas do epitélio escamoso, produzindo um efeito perceptível (IARC, 2019).

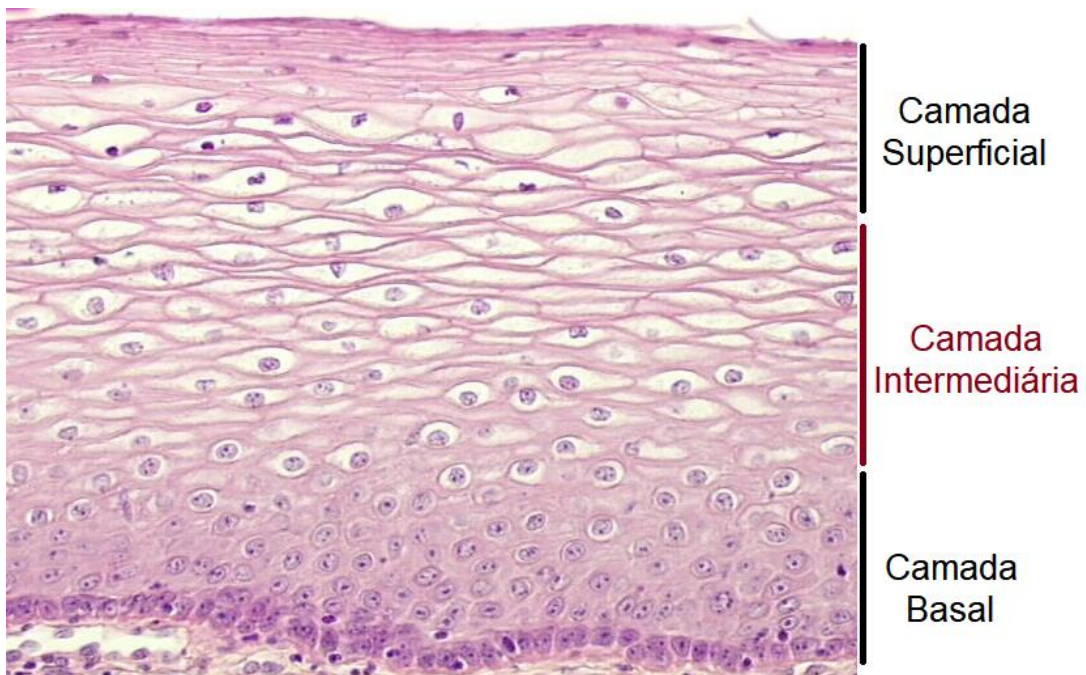
A aplicação do lugol (teste de Schiller) é utilizada para avaliar a presença de glicogênio no epitélio. O iodo (ativo que permite a visualização do teste) é uma substância glicofílica, ou seja, a aplicação do lugol resultará na absorção de iodo pelo epitélio escamoso normal, que contém glicogênio, o qual é corado em castanho escuro ou preto. Porém as áreas de neoplasia não absorvem o iodo, pois não possuem reserva de glicogênio, tornando-se áreas de “cor amarela mostarda” ou “cor de açafrão” (IARC, 2019).

Através da colposcopia é possível avaliar e definir extensões de lesões precursoras e invasoras do colo uterino, guiar biópsias de áreas suspeitas, auxiliar o tratamento de pacientes e dar seguimento após tratamento de lesões do colo uterino (IARC, 2019).

#### 4.2.4 Biópsia

Durante a colposcopia, se forem encontradas áreas suspeitas, normalmente retira-se uma pequena amostra de tecido da lesão (biópsia). O material é submetido ao exame histopatológico com preparação de rotina (Hematoxilina/ Eosina) (Figura 9) (STOFLER et al., 2011).

**Figura 9– Histologia normal do colo uterino**



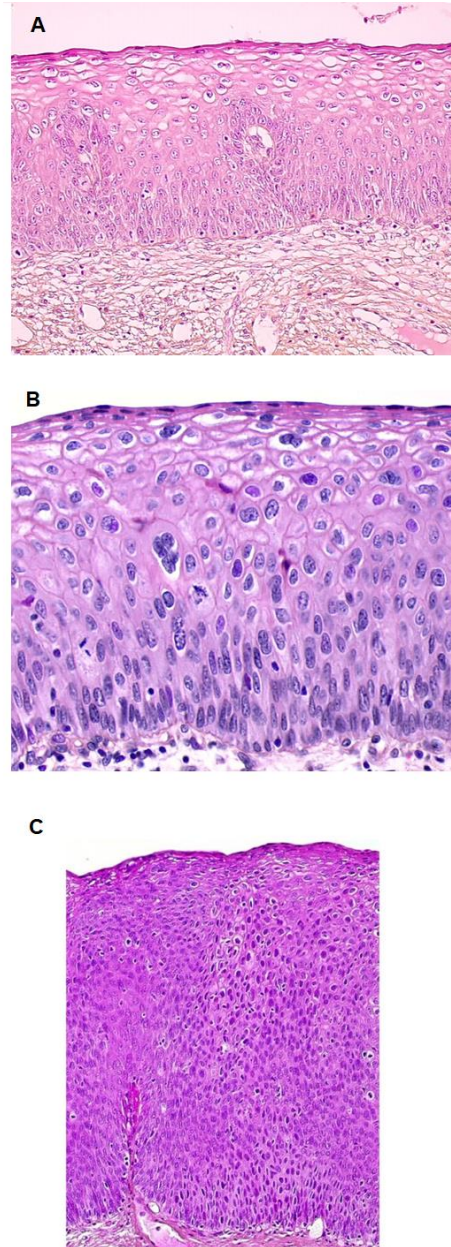
Fonte: Adaptado de (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER –IARC).

O exame é considerado padrão-ouro de diagnóstico morfológico, ou seja, um procedimento definitivo para o diagnóstico das neoplasias do colo do útero. Através do critério morfológico arquitetural e celular (características histológicas relativas à diferenciação, maturação e estratificação das células e anomalias nucleares), é possível de graduar as lesões de acordo com seu potencial maligno (STOFLER et al., 2011).

A evolução da doença neoplásica HPV-induzida no colo uterino é denominada Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). As NICs são divididas, histologicamente, em três graus: NIC 1, caracterizada por atipias celulares localizadas no terço inferior do epitélio escamoso; NIC 2, em que as atipias ocupam os dois terços inferiores desse

epitélio; e NIC 3 em que as células atípicas comprometem mais de dois terços ou toda a espessura do epitélio (Figura 10) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

**Figura 10– Evolução das lesões NIC**



**Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER – IARC)**

Legenda: A) Discreta coilocitose, arquitetura desorganizada no terço inferior do epitélio e presença de coilócitos no terço superior; B) NIC 2, presença de coilócitos, desorganização da metade inferior do epitélio e critérios citológicos de malignidade/ infecção por HPV; C) NIC 3,

as células apresentam elevado grau de alterações nucleares e celulares, típicas de infecção por HPV e o epitélio está alterado nos dois terços inferiores.

#### **4.2.5 Imunohistoquímica e imunocitoquímica**

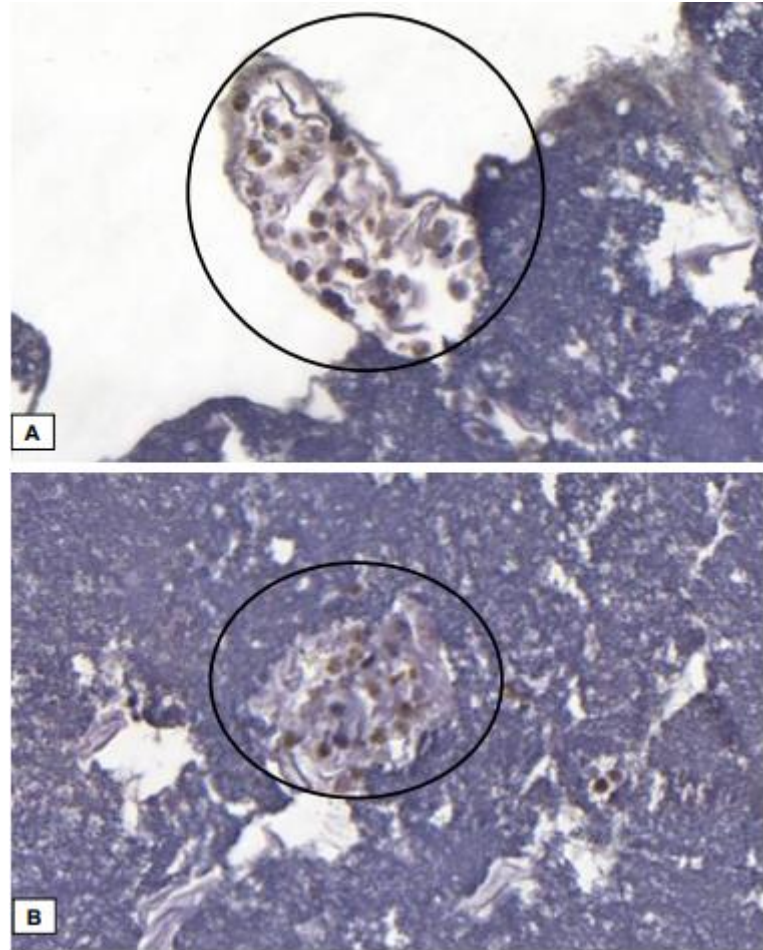
A Imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica que utiliza imuno-ensaios a fim de localizar um epítipo de interesse em cortes histológicos. O método faz uso de anticorpos como reagentes específicos capazes de estabelecer ligações proteínicas diferencialmente expressas. As reações podem ser reveladas com substrato cromógeno ou fluorescente para visualização ao microscópio. A Imunocitoquímica (ICQ) também utiliza a reação antígeno-anticorpo para a detecção e caracterização de moléculas no seu local de origem, mas em amostras colpocitológicas (FERRO, 2013).

A presença de biomarcadores é uma importante informação para o prognóstico e acompanhamento clínico de pacientes. A identificação de novos biomarcadores, mais sensíveis e específicos para determinar a taxa de progressão ou regressão de lesões intraepiteliais, pode representar significativas melhoras nos programas de rastreamento e prevenção, além de apresentar boa relação custo/efetividade (BISHOP et al., 2012; SHAH et al., 2016).

Atualmente, as principais linhas de investigação focam em biomarcadores de supressão tumoral, prognóstico e progressão tumoral, que podem contribuir para identificação de alterações celulares decorrentes da expressão desregulada de oncoproteínas virais (BISHOP et al., 2012).

Dentre as principais proteínas relacionadas aos mecanismos envolvidos na carcinogênese do colo uterino, estão sendo propostas como biomarcadores da doença a p16INK4a e a proteína marcadora de proliferação celular ki-67 (Figura 11), esses marcadores apresentam sensibilidade de 58% e especificidade de 97%. Os principais estudos encontrados na literatura focam na avaliação dos níveis de expressão da p16INK4a em amostras do colo uterino, tanto em cortes histológicos quanto em amostras oriundas de esfregaços colpocitológicos (FONSECA et al., 2016).

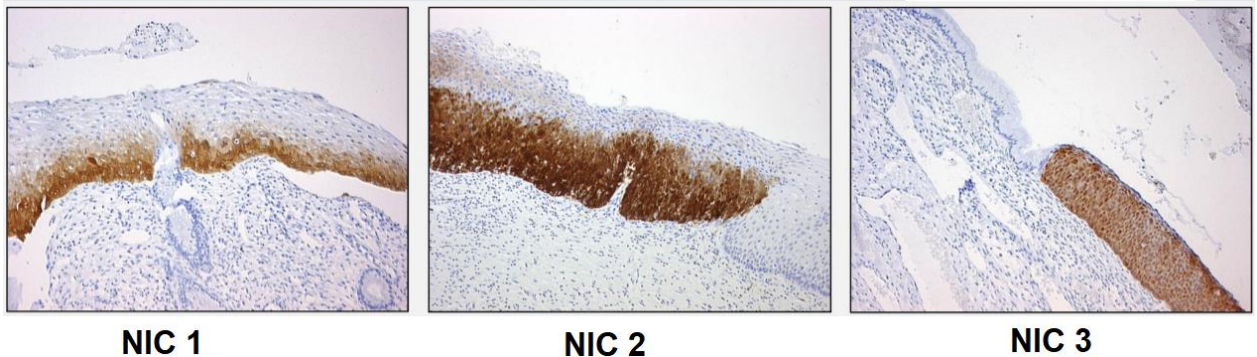
**Figura 11- Expressão de Ki-67 em amostras histopatológicas. A e B – Agrupamento de células escamosas reativas demonstrando coloração nuclear fraca e moderada.**



Fonte: (FIGUEIREDO, 2015)

A expressão de p16 aumenta gradativamente do epitélio normal ao carcinoma invasivo (Figura 12), sendo dessa forma um marcador prognóstico de risco para desenvolvimento de câncer do colo do útero em mulheres infectadas com HPV (PITOL, 2012).

**Figura 12– Amostras histológicas para padrão de marcação observado na IHQ utilizando anticorpo anti p16.**



Fonte: Adaptado de (ROCHE PCR SYMPOSIUM BASEL, 2011).

#### 4.2.6 Hibridização *in situ*

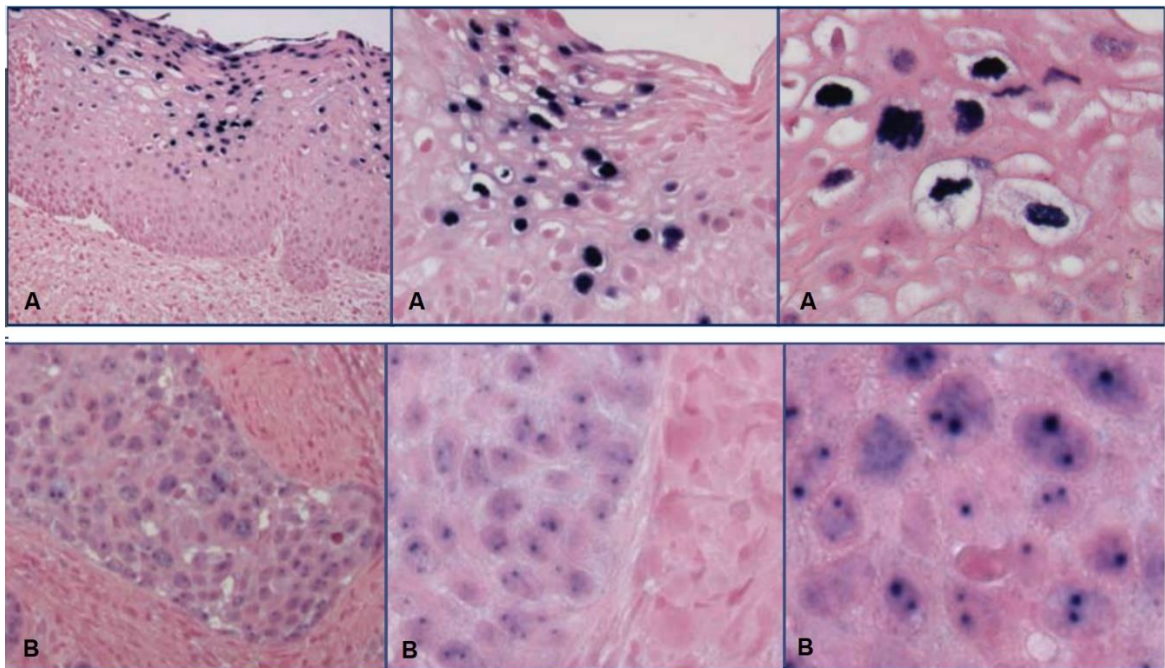
A hibridização *in situ* (ISH) baseia-se na hibridização de sequências específicas de DNA ou ácido ribonucleico (RNA) em amostras teciduais, fixadas em formol e incluídas em parafina, ou em amostras colpocitológicas. As sondas utilizadas na reação podem ser marcadas com compostos fluorescentes na hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), ou com compostos cromogênicos na hibridização *in situ* cromogênica (CISH) (COPPOCK et al., 2018; KIMURA et al., 2017).

As técnicas podem ser explicadas em três procedimentos básicos, sendo eles: 1) desnaturação da dupla-fita de DNA, 2) hibridização com sondas específicas, 3) lavagem para remoção das sondas em excesso. A visualização é realizada através de uma reação imunohistoquímica na ISH, ao microscópio de fluorescência na FISH ou utilizando microscópio óptico na CISH (COPPOCK et al., 2018; KIMURA et al., 2017).

As técnicas são aplicadas para detecção, localização e tipagem do HPV em células infectadas. Através das sondas de DNA, é possível avaliar o estado físico do DNA viral (Figura 13): na sua forma epissomal, quando o DNA viral se encontra disperso pelo núcleo ou integrado, apresentando sinais pontuais. A avaliação do estado físico do vírus é um importante marcador prognóstico, o padrão difuso visualizado nas lâminas é encontrado comumente na NIC 1 e o padrão pontuado está

caracteristicamente presente em carcinomas invasivos (COPPOCK et al., 2018; KIMURA et al., 2017)

**Figura 113– Reação por hibridização in situ. As imagens marcadas como “A” representam o padrão epissomal, visualizado como um grande e homogêneo precipitado azul marinho no interior do núcleo das células escamosas (marcações difusas). As imagens marcadas como “B”, representam o padrão integrativo do DNA viral (pontilhado azul marinho).**



Fonte: Adaptado de (THOMAS, 2006).

As sondas de RNA específicas para oncogenes E6 e E7 de HPVs de alto risco são importantes marcadores de progressão tumoral. A detecção do RNA mensageiro (RNAm) E6/ E7 permite o monitoramento da atividade oncogênica do HPV, pois detecta a transcrição ativa do DNA viral. De acordo com a literatura, os oncogenes são identificados em mais de 90% dos casos NIC 2 e 3, ou câncer do colo do útero, ou seja, quanto maior a expressão de RNAm E6/E7 maior será a gravidade das lesões, concluindo que a identificação desses oncogenes é de alto valor prognóstico (COPPOCK et al., 2018; CASTRO et al., 2015).

A ISH apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade. Quando comparadas, a FISH demonstra maior sensibilidade do que a CISH. Estes métodos apresentam elevado potencial na identificação de genótipos de alto risco do HPV e

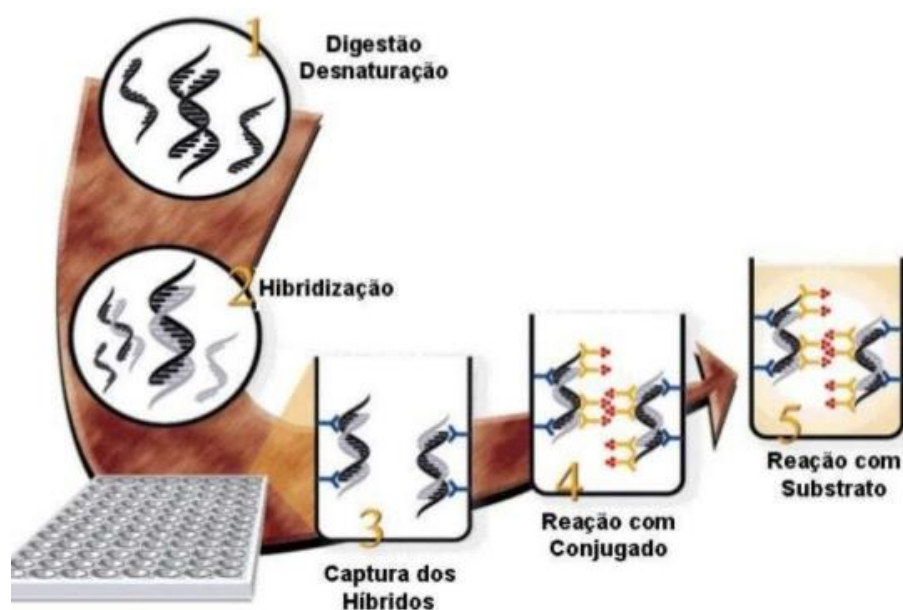
são aplicados como ferramentas complementares a outras técnicas como a biópsia e IHQ (COPPOCK et al., 2018).

#### 4.2.6 Captura híbrida

O teste de captura híbrida (CH) baseia-se na hibridização do DNA viral, utilizando sondas específicas, as quais identificam genótipos virais de alto e baixo risco em amostras colpocitológicas. O teste não é capaz de determinar o tipo específico presente na amostra clínica, porém revela o risco oncogênico do vírus presente e apresenta alta sensibilidade (90%) e especificidade (98%), sendo por essa razão um dos métodos moleculares mais empregados na prática clínica (SILVA et al., 2015; POLJAK et al., 2011).

As amostras que contém o DNA viral alvo hibridizam com as sondas complementares de RNA do HPV, formando moléculas híbridas de DNA fita dupla, na qual uma das fitas é de origem viral e a outra é a sonda RNA-HPV. Os híbridos são então capturados por anticorpos específicos imobilizados sobre a superfície de uma microplaca e revelados através de reação quimioluminescente (Figura 14) (SILVA et al., 2015).

**Figura 14- Processo de Captura Híbrida**



Fonte: (RAMOS, 2013).

O teste pode ser realizado em até quatro horas, permitindo a liberação dos laudos no mesmo dia com resultados consistentes, o que agiliza a conduta terapêutica. As sondas de RNA identificam 13 genótipos de alto risco (18, 16, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e 5 genótipos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44). Todos os testes de CH2 são ao mesmo tempo, quantitativos e qualitativos (SILVA et al., 2015; POLJAK et al., 2011).

A CH pode ser utilizada como um marcador prognóstico no acompanhamento de pacientes com resultados colpocitológicos anormais. O diagnóstico de pacientes com CH positiva para genótipos de alto risco do HPV indica possibilidade de desenvolvimento de neoplasias. Mulheres com este tipo de resultado podem ser selecionadas e acompanhadas separadamente daquelas com HPV negativo, que por sua vez, podem voltar com segurança para o rastreamento normal (SILVA et al., 2015; POLJAK et al., 2011).

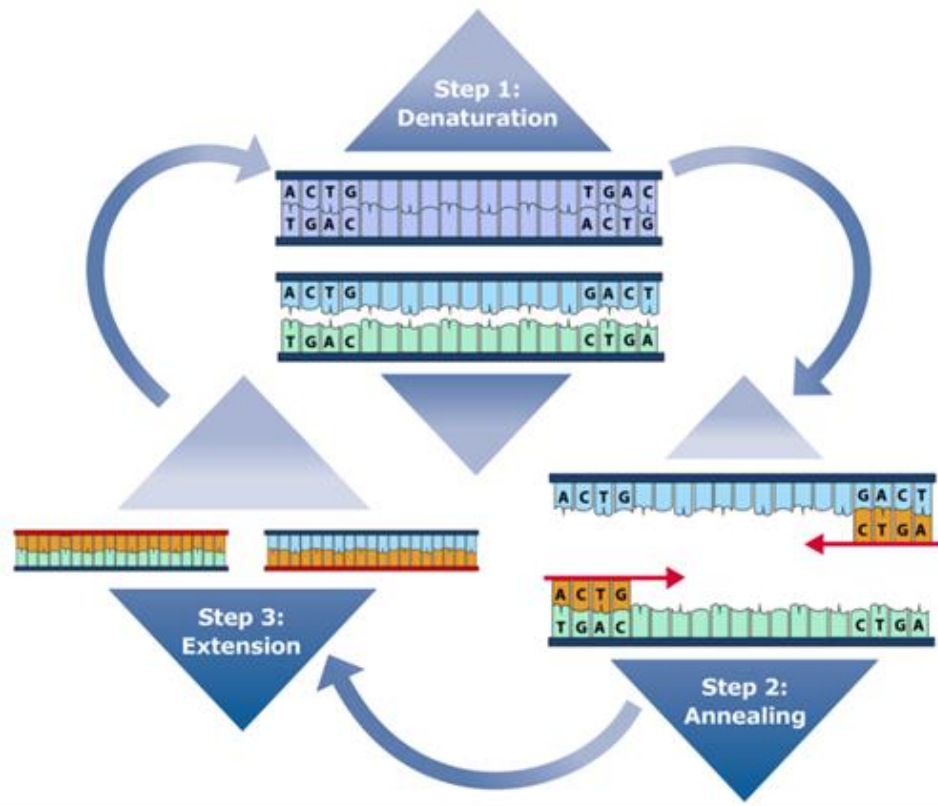
A CH pode ser empregada em políticas de rastreamento do câncer do colo do útero, como acompanhamento de amostras colpocitológicas anormais, uma vez que a identificação precoce de pacientes em maior risco de uma lesão e HPV positivas favorece um acompanhamento mais cauteloso e eficaz (SILVA et al., 2015).

#### **4.2.7 Reação em cadeia polimerase**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representa um método sensível (98 a 100%) e específico (92.8 a 100%) para detecção do HPV em esfregaços colpocitológicos e fragmentos de biópsia. O teste baseia-se na síntese de ácidos nucleicos, onde segmentos específicos de DNA-alvo são amplificados. Esta técnica de amplificação de ácidos nucleicos exige quantidades reduzidas de DNA viral, ou seja, apenas uma célula infectada na amostra (OLIVEIRA, 2016).

A PCR é um processo termo cíclico que inclui três etapas (Figura 15). A – Desnaturação da dupla fita de DNA, formando duas fitas simples; B – Anelamento dos primers que se hibridizam especificamente a sequência complementar ao DNA alvo. C- Incorporação dos nucleotídeos pela TAq DNA polimerase gerando uma fita filha, que vão servir como molde para os próximos ciclos (LETO, 2011).

Figura 15– Representação esquemática da PCR.



Fonte: (POLJAK et al., 2011).

A PCR apresenta a vantagem de identificar diferentes tipos de HPV de alto risco e não apenas separá-los em grupos oncogênicos e não oncogênicos. Através destas técnicas de amplificação, é possível também avaliar a expressão das oncoproteínas E6 e E7, o que permite diferenciar infecção latente de infecção com doença. Essas informações, juntamente com a avaliação do médico sobre o histórico de triagem, outros fatores de risco e diretrizes profissionais, podem ser usadas para orientar a conduta da paciente. A principal desvantagem do teste é o alto custo do equipamento e sua utilização, que demanda mão de obra altamente treinada e qualificada (OLIVEIRA, 2016; SILVA, 2015).

No Brasil, a técnica é utilizada como ferramenta complementar à triagem colpocitológica, com intuito de identificar o tipo viral presente na amostra, podendo determinar a necessidade de encaminhamento para colposcopia. Vale ressaltar que, de acordo com o FDA a PCR não é mais considerada teste complementar, sendo em

alguns países a primeira escolha de abordagem para o rastreio do câncer do colo do útero (POLJAK et al., 2011).

## 5. CONCLUSÃO

Com o presente estudo, podemos concluir que o rastreamento do câncer do colo do útero baseia-se na progressão natural da doença que evolui a partir de lesões precursoras (lesões intraepiteliais, induzidas pela infecção persistente do HPV), as quais podem ser detectadas e tratadas adequadamente quando diagnosticadas precocemente. O teste de Papanicolaou é o método de rastreamento de escolha no serviço público do Brasil. Mulheres com lesões intraepiteliais do colo uterino, rastreadas no exame colpocitológico, de acordo com as diretrizes clínicas estabelecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), devem ser encaminhadas a exames de confirmação diagnóstica através da colposcopia, e biópsia (padrão ouro). Além das ferramentas morfológicas supracitadas, também são aplicadas no sistema privado de saúde, ferramentas biomoleculares, as quais são importantes para a determinação do potencial para desenvolvimento do câncer (valor prognóstico), pois identificam e classificam os genótipos virais de acordo com seu risco oncogênico. Por esta razão, no Brasil, a biologia molecular é comumente empregada como método complementar na tomada de decisão sobre o acompanhamento e tratamento de pacientes com lesões induzidas por HPV, principalmente em casos controversos.

## REFERÊNCIAS

BISHOP, Ja et al. Detection of transcriptionally active high risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. **The American Journal Of Surgical Pathology**. 0, p. 1874-1882. dez. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3500437/pdf/nihms395997.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BRASÍLIA. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **CONTROLE DOS CÂNCERES DO COLO DO ÚTERO E DA MAMA**. 2013. Disponível em: <<http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/cab13.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2019.

BRINGHENTI, Márcia Elena. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Santa Catarina, v. 22, n. 3, p.135-140, 2010. Editora da Universidade Federal Fluminense. <http://dx.doi.org/10.5533/2177-8264-201022305>. Disponível em: <<http://www.dst.uff.br/revista22-3-2010/Prevencao%20do%20Cancer%20Cervical.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

BRITO, Valesca Pereira Santos. **ASPECTOS CITOMORFOLÓGICOS E HISTOMORFOLÓGICOS DAS LESÕES INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE BAIXO GRAU (LSIL) E DAS LESÕES INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU (HSIL)**. 2011. 34 f. Monografia (Especialização) - Curso de Citologia Clínica, Universidade Paulista Centro de Consultoria Educacional, Recife, 2011. Disponível em: <<https://www.cceursos.com.br/img/resumos/citologia/05.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2019.

CASTRO, Felipe A. et al. Detection of HPV DNA in paraffin-embedded cervical samples: a comparison of four genotyping methods. **Bmc Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 15, n. 1, p.1-11, 25 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1281-5>. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12879-015-1281-5>>. Acesso em: 9 set. 2019.

CIBAS, Edmund; DUCATMAN, Barbara. **Cytology**. 3. ed. 0: Springer, 2009. 348 p.

COLONELLI, Daniela Etlinger. **Avaliação do desempenho da citologia em meio líquido versus citologia convencional no Sistema Único de Saúde**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

COPPOCK, Joseph D. et al. HPV RNA in situ hybridization can inform cervical cytology-histology correlation. **Cancer Cytopathology**, Arizona, v. 126, n. 8, p.533-540, 5 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.22027>.

DAMACENA, Andressa Moura et al. Rastreamento do câncer do colo do útero em Teresina, Piauí: estudo avaliativo dos dados do Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero, 2006-2013\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.71-80, jan. 2017. Instituto Evandro Chagas. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742017000100008>. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2237-96222017000100071&lng=pt&nrm=iso&tling=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222017000100071&lng=pt&nrm=iso&tling=pt)>. Acesso em: 14 jan. 2019

DOORBAR, John et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Elsevier**, Londres, v. 30, n. 5, p.55-70, nov. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12009735?via%3Dihub#sec0005https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12009735?via%3Dihub#sec0005>>. Acesso em: 17 fev. 2019. + (DOORBAR et al., 2012).

FERRAZ, Laís de Campos. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, Campinas, v. 2, n. 30, p.107-111, jun. 2012. Disponível em: <[https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02\\_abr-jun/V30\\_n2\\_2012\\_p107-111.pdf](https://www.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02_abr-jun/V30_n2_2012_p107-111.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2019.

FERRO, Amadeu Borges. **Imunohistoquímica**. 2013. 138 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, 2013. Disponível em: <<https://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

FIGUEIREDO, Anna Carolina Cançado. **CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RAP1 EM BLOCOS DE CÉLULAS ESCAMOSAS PROVENIENTES DE CITOLOGIA CERVICAL EM MEIO LÍQUIDO**. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2015. Disponível em:

<[https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/10915/2/Dissertacao\\_BCM\\_AnnaCarolinaCan%  
c3%a7adoFigueiredo%20PDF.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/10915/2/Dissertacao_BCM_AnnaCarolinaCan%c3%a7adoFigueiredo%20PDF.pdf)>. Acesso em: 22 nov. 2019.

GRAHAM, Sheila V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiology**, v. 5, n. 10, p.1493-1506, out. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.107>.

HOLOGIC. Manual do Operador Thinprep 500. **Processador ThinPrep® 5000**. 2011. Disponível em: <[https://www.hologic.com/sites/default/files/2018-05/MAN-02203-602\\_003\\_02.pdf](https://www.hologic.com/sites/default/files/2018-05/MAN-02203-602_003_02.pdf)>. Acesso em: 7 jul. 2019.

HOPMAN, Anton Hn et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. **The Journal Of Pathology**, Maastricht, v. 202, n. 1, p.23-33, 18 dez. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1490>.

HOPMAN, Anton Hn et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. **The Journal Of Pathology**, Maastricht, v. 202, n. 1, p.23-33, 18 dez. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1490>.

IARC, International Agency Of Research On Cancer. **A practical manual on visual screening for cervical neoplasia: Anatomical and pathological basis of visual inspection with acetic acid (VIA) and with Lugol's iodine (VILI)**. 2019. Disponível em: <<https://screening.iarc.fr/viavilichap1.php?lang=1>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2016. 160 p. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/12/livro-completo-manual-citopatologia.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Câncer do Colo do Útero: Conceito e Magnitude**. 2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-uterio/conceito-e-magnitude>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Falando sobre câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: Inca, 2002. 59 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/falando\\_cancer\\_colo\\_uterio.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/falando_cancer_colo_uterio.pdf)>. Acesso em: 2 set. 2019.

KIMURA, Lidia Midori et al. Padronização do protocolo de hibridização in situ cromogênica (CISH) para detecção de HPV de alto e baixo risco com a utilização da sonda comercial marcada com digoxigenina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 14, n. 158, p.1-11, fev. 2017. Disponível em: <[http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2017/edicao\\_158\\_-\\_fevereiro\\_2.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2017/edicao_158_-_fevereiro_2.pdf)>. Acesso em: 23 out. 2019.

LETO, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p.206-317, abr. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962011000200014&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000200014&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 15 mar. 2018.

LIMA, Daisy Nunes de Oliveira et al. **Citopatologia Ginecológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 194 p. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico\\_citopatologia\\_caderno\\_referencia\\_1.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf)>. Acesso em: 31 ago. 2019.

MACLACHLAN, Nigel J. et al. Papillomaviridae e Polyomaviridae. In: MACLACHLAN, Nigel J.. **Fenner's Veterinary Virology**. 5. ed. Londres: Elsevier, 2017. Cap. 11. p. 229-243.

MELO, Simone Cristina Castanho Sabaini de et al. ALTERAÇÕES CITOPATOLÓGICAS E FATORES DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Porto Alegre, v. 30, n. 4, p.602-608, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rgenf/v30n4/a04v30n4>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer, 2016. 118 p. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero\\_2016\\_corrigido.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero_2016_corrigido.pdf)>. Acesso em: 31 ago. 2019.

Ministério da Saúde. **Cadernos de Atenção Básica: Controle dos casos de cânceres do colo do útero e mama.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde (MS), 2013. 128 p. Disponível em: <<http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/cab13.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

Ministério da Saúde. **Parâmetros Técnicos Para O Rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero.** Rio de Janeiro: Ministério da Saúde Ms, 2019. 159 p. Disponível em: <[http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/988200/parametros-tecnicos-colo-do-uterio\\_2019.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/988200/parametros-tecnicos-colo-do-uterio_2019.pdf)>. Acesso em: 1 abr. 2019.

MITTELDORF, Cristina Aparecida T. S.. Triage de câncer do colo uterino: do teste de Papanicolaou a estratégias futuras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** Rio de Janeiro, p. 238-245. ago. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470206/>>. Acesso em: 23 maio 2018.

OLIVEIRA, StÉphanny SallomÉ Sousa. **O HPV E SUAS PRINCIPAIS FORMAS DE DIAGNÓSTICO.** 2016. 35 f. Tese (Doutorado) - Curso de Citologia Clínica, Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa Centro de Capacitação Educacional, Recife, 2016. Disponível em: <<https://www.cceursos.com.br/img/resumos/o-hpv-e-suas-principais-formas-de-diagn-stico-tcc---stephanny-sallome-sousa-oliveira.pdf>>. Acesso em: 21 maio 2019.

OLIVEIRA, Mauren Isfer Anghebem; MERLIN, Júlio Cezar. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** Curitiba, v. 3, n. 42, p.181-185, fev. 2010. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Mauren\\_Anghebem-Oliveira/publication/260833892\\_A\\_PROTEINA\\_P16\\_E\\_UM\\_NOVO\\_MARCADOR\\_PARA\\_PROGRESSAO\\_NEOPLASICA\\_NO\\_COLO\\_UTERINO/links/55c4c6d608aebc967df37f08/A-PROTEINA-P16-E-UM-NOVO-MARCADOR-PARA-PROGRESSAO-NEOPLASICA-NO-COLO-UTERINO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mauren_Anghebem-Oliveira/publication/260833892_A_PROTEINA_P16_E_UM_NOVO_MARCADOR_PARA_PROGRESSAO_NEOPLASICA_NO_COLO_UTERINO/links/55c4c6d608aebc967df37f08/A-PROTEINA-P16-E-UM-NOVO-MARCADOR-PARA-PROGRESSAO-NEOPLASICA-NO-COLO-UTERINO.pdf)>. Acesso em: 12 ago. 2019.

PITOL, B C V. Análise da Expressão das Proteínas p16, p53 e L1/HPV nas Lesões Intraepiteliais Cervicais. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

POLJAK, M. et al. Comparison of Clinical and Analytical Performance of the Abbott RealTime High Risk HPV Test to the Performance of Hybrid Capture 2 in Population-

Based Cervical Cancer Screening. **Journal Of Clinical Microbiology**, Ljubljana Zaloska, v. 49, n. 5, p.1721-1729, 23 mar. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00012-11>. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/49/5/1721.full.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2019.

RAMOS, Elenice. **A importância do teste de Captura Híbrida 2 no acompanhamento de pacientes tratadas por Lesão Intraepitelial cervical de alto grau**. 2013. 71 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, Universidade Federal da Bahia Faculdade de Medicina Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Bahia, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7137/1/Elenice%20Ramos.%20A%20importancia%20do%20teste...2013.pdf>. Acesso em: 3 out. 2019.

ROCHE PCR SYMPOSIUM BASEL, 18., 2011, Alemanha. **P16/Ki-67 Dual-stained Cytology in Screening for Cervical Disease and as a Triage in Pap-negative / HPV-positive Cases**. Frankfurt: Mvz Cytology And Molecular Biology, 2011. 37 p.

SHAH, Sunny et al. Current Technologies and Recent Developments for Screening of HPV-Associated Cervical and Oropharyngeal Cancers. **Cancers**, Notre Dame, v. 8, n. 9, p.8-85, 9 set. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers8090085>.

SHAH, Sunny et al. Current Technologies and Recent Developments for Screening of HPV-Associated Cervical and Oropharyngeal Cancers. **Cancers**, Notre Dame, v. 8, n. 9, p.1-27, 9 set. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers8090085>. + SHAH et al., 2016.

SILVA, Daliana Caldas et al. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions – A systematic review. **Pathology - Research And Practice**, Natal, v. 213, n. 7, p.723-729, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.03.003>.

SILVA, Elisvania Rodrigues da et al. Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. **Revista Femina**, Minas Gerais, v. 43, n. 4, p.181-184, ago. 2015. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2015/v43n4/a5311.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SONG, Hyung Geun et al. Evaluation of p16INK4a, pRb, p53 and Ki-67 expression in cervical squamous neoplasia. **Research Institute Of Veterinary Medicine.**, S, v. 13, n. 6, p.209-217, set. 2012.

STABILE, Sueli Aparecida Batista et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncótica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. **Revista Einstein**, Paraná, v. 10, n. 4, p.466-472, jan. 2012. Disponível em: <[https://journal.einstein.br/wp-content/uploads/articles\\_xml/1679-4508-eins-S1679-45082012000400013/1679-4508-eins-S1679-45082012000400013-pt.x37191.pdf](https://journal.einstein.br/wp-content/uploads/articles_xml/1679-4508-eins-S1679-45082012000400013/1679-4508-eins-S1679-45082012000400013-pt.x37191.pdf)>. Acesso em: 25 jun. 2019.

STOFLE, Maria Eduarda Carvalho Wagnes et al. Avaliação do desempenho da citologia e colposcopia comparados com a histopatologia no rastreamento e diagnóstico das lesões do colo uterino.: Performance evaluation of cytology and colposcopy compared with histopathology in screening and diagnosis of cervix lesions.. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Santa Catarina, v. 40, n. 3, p.30-36, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/876.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

THOMAS M. GROGAN. **N463 0306**: Interpretation Guide for Ventana INFORM HPV Probes In Situ Hybridization (ISH) Staining of Cervical Tissue. Estados Unidos: Ventana Medical Systems, 2006.