

PRINCIPAIS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA DETECÇÃO GENOTÍPICA DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV): REVISÃO DA LITERATURA

^{1,2} Felipe da Silva Arruda, João Luiz Quirino da Silva Filho^{1,2}
Jacinto da Costa Silva Neto¹
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil¹
Faculdade de Interação do Sertão, Serra Talhada-PE, Brasil²

Resumo

Anualmente são detectados em média 500.000 novos casos de câncer de colo uterino em escala mundial, destes, 99% estão correlacionados ao papilomavírus humano (HPV) sendo de grande importância técnicas seguras de detecção do vírus. O objetivo desta revisão de literatura foi descrever técnicas de identificação genotípicas do HPV e compará-las, destacando suas vantagens e desvantagens, possibilitando aos pesquisadores a escolha da técnica mais apropriada para aplicação em pesquisas diversas. Metodologia: foram avaliadas 24 publicações em língua inglesa e portuguesa, publicadas no período de 2000 a 2014 disponíveis em bancos de dados da Scielo Brasil, Science Direct e Pubmed, além da internet livre. Foram selecionados artigos que apresentaram no título ou resumo os descritores genotyping of HPV mais no mínimo um descritor variável, entre eles human papillomavirus; PCR (polymerase Chain reaction) e suas variações: PCR em tempo real (qRT – PCR); PCR-RFLP (Restriction fragmente length polymorphism); Nested – PCR; captura híbrida e Microarranjos. Resultados e conclusões: Dentre as técnicas citadas neste artigo, todas possuem uma alta relevância na identificação genotípica do HPV, logo é de escolha do pesquisador qual técnica melhor se adequa às necessidades de cada pesquisa. Pode-se considerar a técnica de Nested – PCR como a mais vantajosa dentre todas as técnicas citadas para detecção do DNA viral, pelo fato de possuir maior sensibilidade em comparação com as demais técnicas descritas.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Câncer cervical. Genotipagem. PCR.

Abstract

Detected are annually on average 500,000 new cases of cervical cancer worldwide, of whom 99% are related to the human papillomavirus (HPV) is of great importance safe techniques of virus detection. The aim of this review was to describe genotypic identification techniques of HPV and compare them, highlighting their advantages and disadvantages, enabling researchers to choose the most appropriate technique for application in various surveys. Method: were evaluated 24 publications in English and Portuguese, published from 2000 to 2014 available in databases Scielo Brazil, Science Direct and Pubmed, as well as free internet. Articles were selected that showed the title or the summary descriptors of HPV genotyping at least one more variable descriptor, including human papillomavirus; PCR (Polymerase Chain Reaction) and variations thereof: Real-time PCR (qRT - PCR); PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism); Nested - PCR; hybrid and microarray capture. Results and conclusions: Among the techniques mentioned in this article, all have a high relevance in the genotypic identification of HPV, so it's choice of the researcher which best technique suited to the needs of each search. It can be considered Nested - PCR as the most advantageous of all the techniques mentioned for the detection of viral DNA, because of having higher sensitivity compared to the other techniques described.

Keywords: Human papillomavirus. Cervical Cancer. Genotyping. PCR.

Introdução

Segundo estudos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados 15.590 novos casos de câncer de colo do útero para 2014, o que corresponde a 16 casos a cada 100 mil mulheres, esta neoplasia tem se configurado um grave problema de saúde mundial. (INCA, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que esta patologia atinge cerca de 9 milhões de pessoas por ano, e, em média, 5 milhões vem a óbito devido ao câncer (FRIGATO, 2003). O câncer de colo do útero (CCU) é a terceira maior causa de mortes por câncer entre as mulheres no Brasil, porém não é apenas um problema de saúde pública brasileira é também de outros países, sendo que, aproximadamente, 80% desses casos, são vistos em países em desenvolvimento (SOARES, 2011).

O CCU é uma patologia que demonstra evolução lenta, que percorrem fases benigna, pré-invasivas e invasivas, que são caracterizadas como neoplasias intraepiteliais de cérvix uterina (NICs), sendo consideradas ainda como de alto e baixo grau segundo o Sistema Bethesda (2011) (SANTOS, MACEDO, LEITE, 2010).

A partir dos estudos de Frigato e Hoga (2003) o controle de CCU necessita de ações referentes à prevenção de infecções pelo papiloma vírus humano (HPV) que é transmitido principalmente por ato sexual. Além de início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, uso de anticoncepcional oral, tabagismo, outros hábitos de risco e baixas condições socioeconômicas, têm sido citadas como fatores de risco para desenvolvimento de lesões e câncer (FRIGATO; HOGA 2003).

A principal forma de prevenção do CCU é a realização do exame de Papanicolaou, também

conhecido como exame citopatológico de cérvix uterina ou exame de prevenção do colo do útero, consiste em coleta esfoliativa das células de colo uterino, fixação da amostra em lâmina para ser corada e feita análise morfológica por especialistas. O ministério da saúde preconiza que o exame seja realizado por todas as mulheres que tenham iniciado sua vida sexual (QUEIROZ, 2013). A eficácia do exame Papanicolaou reside no fato de que ele pode detectar doenças que ocorrem no colo uterino antes do desenvolvimento do câncer (GOMES et al., 2008).

A relação de oncogênese do HPV e o CCU está bem estabelecida na literatura atual. O DNA dos HPVs de alto risco são detectados na maioria dos raspados de colo uterino (92,6% a 99,7%) com lesões e ou carcinomas (FERREIRA, 2009). Existem mais de 100 tipos virais do HPV, logo a análise e classificação do vírus permite melhor direcionamento das terapias antivirais e das drogas utilizadas, possibilitando, assim, os avanços científicos em relação à patologia e busca da cura. Com o desenvolvimento da biotecnologia, a biologia molecular se torna uma grande ferramenta na identificação segura e rápida dos vários subtipos de HPVs o que permite um melhor acompanhamento no tratamento e melhor prognósticos (ASSUNÇÃO E CORREIA, 2014).

O objetivo desta revisão é apresentar as diversas técnicas de detecção viral do HPV e descrever as mesmas, com o intuito de permitir um melhor conhecimento das técnicas moleculares que possam se enquadrar para identificar os estudos de identificação de subtipos de HPVs.

Metodologia

O presente estudo constitui-se de uma revisão da literatura de artigos publicados entre o período de 2000 a 2015 quanto às técnicas de biologia molecular (genotipagem) para identificação de HPVs. As pesquisas foram realizadas em bancos de dados da Scielo Brasil, Science Direct e Pubmed, além da internet livre durante o período de janeiro a junho de 2015. A partir de uma análise de 62 publicações, foram

selecionados 24 artigos, que serviram de base para a revisão.

Os artigos selecionados deveriam apresentar no título ou resumo os descritores genotyping of HPV, mais no mínimo, um descritor variável, entre eles human papillomavirus; PCR (polymerase Chain reaction); hybrid capture.

Resultados e Discussões

A detecção do HPV é de grande importância para início de uma terapêutica, desta forma os avanços biotecnológicos e a biologia molecular permitem várias metodologias que serão listadas nesta revisão.

OBTENÇÃO DE AMOSTRAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PAPANICOLAOU

Foi observado dentre os artigos que a principal forma de obtenção das amostras biológicas para detecção do HPV, consiste na coleta de células da região de colo uterino através da técnica de Papanicolaou, também conhecido como exame citopatológico ou ainda exame de prevenção. Esta técnica por sua vez não é uma metodologia de biologia molecular, porém necessita ser abordada, pois a partir desta será obtida as amostras para serem realizados testes moleculares. Logo que o exame de papanicolaou é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como ferramenta de rastreio para identificação de lesões ocasionadas pelo HPV. A coleta consiste na visualização do colo do útero, utilizando o espécule e, em seguida, utiliza-se a espátula de Ayre e escova endocervical para coleta esfoliativa de células da endocervice e ectocervice, e imediatamente estas células são depositadas em uma lâmina previamente identificada e processada com uma bateria de coloração que possui um conjunto de três corantes: Hematoxilina, OG-36 e EA-36 ou EA-65 (HASENACK et al., 2008). Após a coloração, as lâminas são analisadas por profissionais especialistas em citopatologia e classificadas como normais, lesão intraepitelial de baixo grau, lesão intraepitelial de alto grau, carcinoma in situ, carcinoma e atípias.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERIZAÇÃO – PCR

Uma das técnicas de biologia molecular mais empregada para na identificação e genotipagem viral é a reação

em cadeia da polimerase (PCR), a mesma tem como objetivo a amplificação de sequências específicas do material genético em estudo. Existem na literatura dois tipos de PCR, genérica ou específica. Na técnica de PCR genérica, os primers que são sequência de nucleotídeos, desenvolvidos de acordo com o trecho que deseja amplificar, tem papel de sinalizador de início e término do fragmento sendo complementares a uma sequência alvo que flanqueiam a região a ser amplificada. O vírus do HPV possui sua região alvo e a região L1. Já a PCR específica, realiza a genotipagem viral com primers que são complementares às regiões com variação de nucleotídeos, sendo assim, capazes de identificar o subtipo viral; desta forma, os primers utilizados são chamados de específicos.

Logo, pode-se concluir que o uso de primers consensuais é indicado quando o objetivo é identificar a presença ou não do vírus nas amostras analisadas, e, no específico, é possível além de identificar, determinar qual dos mais de 100 tipos virais estão na amostra (MAGALHÃES et al., 2008).

A técnica de PCR pode ser dividida em três etapas que necessitam passar por um pré-aquecimento a 94°C durante 4 minutos. A primeira etapa consiste na desnaturação, processo em que a dupla fita é separada por aquecimento a 94°C durante 30 segundos; na segunda etapa, conhecida como anelamento, os primers (que irão funcionar como sinalizador de início e término do fragmento) associando-se ao DNA de fita simples em uma temperatura de 45°C durante 1 minuto; por fim é realizado a etapa de extensão, na qual, a enzima DNA polimerase deve reconhecer o primer presente na região 5'-3', que funciona como sítio de inicialização de síntese da nova fita o que ocorre em temperatura de 72°C por 1 minutos e 30 segundos, esse ciclo se repete 40 vezes, finalizando com uma extensão da fita formada a 4°C durante 10 minutos (CARVALHO, et al., 2010).

A técnica de PCR é acompanhada de uma técnica chamada de eletroforese, a qual permite a visualização das bandas do material genético (fragmentos proteicos). Podem ser utilizados, como amostras, diferentes materiais genéticos como RNA, DNA ou proteínas. São utilizados na técnica de eletroforese princípios físico-químicos para separação dos fragmentos. É utilizado o gel de agarose 2% que é colocado em solução tampão, por onde irá passar uma corrente elétrica. No caso do material genético do HPV, se o DNA possuir carga negativa, logo a amostra migrará do polo negativo para o positivo quando aplicado uma corrente ao sistema montado. Após a corrida do DNA, o gel é corado em solução de SYBER® GREEN ou brometo de etídio. De acordo com o peso molecular dos fragmentos estes serão dispostos, de tal modo que fragmentos com menor peso molecular ficarão na porção mais inferior do gel. Logo será possível a visualização das bandas formadas no gel utilizando-se luz UV. Contudo, o teste se dará positivo para o DNA do HPV pela técnica de PCR quando ocorre a presença das bandas correspondentes às regiões gênicas que identificam o vírus.

PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem como objetivo a conversão da fita simples de mRNA em DNA complementar (cDNA), tal mudança ocorre com a utilização da enzima transcriptase reversa. E a reação da PCR será realizada através de cDNA; logo a utilização da técnica RT-PCR é de grande importância quando o pesquisador detém um organismo que possui um genoma de fita simples como no caso do RNA. Com a conversão das características da fita simples para DNA, é que as principais técnicas de biologia molecular poderão ser empregadas.

A conversão do RNA em DNA é de fundamental importância para realização da técnica de PCR em tempo real. A qRT-PCR, possui as três primeiras etapas da PCR convencional, sendo diferenciada pela possibilidade de quantificação de expressão de material genético viral em tempo real; esse fenômeno é possível de ser visto durante a execução da técnica pela formação de gráficos que tem como principal objetivo monitorar a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção de DNA amplificado em cada ciclo de PCR. A fluorescência pode ser obtida por vários métodos, pelo brometo de etídio ou o mais utilizado o corante intercalador de bases

SYBR® Green, porém em técnicas mais avançadas, como a de Beacons, que são oligonucleotídeos que possuem em fluoroforo na ponta 5' e na extremidade 3' um não-fluoroforo (quencher-apagador), tem sido utilizado.

A técnica de Beacon tem como princípio o fato de que na fase inicial da PCR, as pontas 5'-3' estarem próximas uma a outra, isso permite a transferência de energia do corante repórter para o apagador, impedindo assim possível emissão de radiação, porém se o processo avança para a etapa de anelamento, quando ocorre o resfriamento com a baixa da temperatura, ocorre a hibridização dos sinalizadores, que neste momento irão se apresentar de maneira linear. Na nova estrutura formada, será emitida radiação pelo corante repórter que será detectável, e a emissão de fluorescência será proporcional ao material amplificado. E a extensão da enzima DNA polimerase não será impedida pelo sinalizador, pois este será removido com o prolongamento da fita alvo (BROCCOLO, COCUZZA, 2007).

São empregados alguns equipamentos para aferição da radiação emitida pelo sinalizador, são eles: sistema óptico, termociclador, hardware e um software específico de interface. A qRT-PCR possui três fases particulares, além da fase convencional: fase exponencial, na qual é acumulado o dobro do produto de cada ciclo; fase linear, na qual os reagentes são utilizados com grande variabilidade; e a fase platô, em que acontece o fim da reação, ou seja, a partir desta fase os produtos não mais serão produzidos, apenas degradados, é nesta mesma etapa que na PCR tradicional é realizado a aplicação do produto da PCR no gel de agarose 2%.

PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

O emprego da técnica de reação em cadeia da polimerase por restrição de extensões de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP) junto a convencional, possibilita a detecção de cerca de 40 tipos diferentes de HPV. Tal técnica faz uso de enzimas de restrição para detecção do genótipo viral. Consiste na amplificação do DNA por uma PCR convencional, seguida do processo da ação enzimática, que são capazes de reconhecer regiões sítios de restrição específicos e cliválos; ao longo do material genético de um indivíduo

existem alterações que geram polimorfismos. Ao clivar as moléculas, as endonucleares formam fragmentos com diferentes pesos moleculares. Sendo assim, com o auxílio de sondas hibridizadoras, a detecção das variações gênicas do HPV ou algum organismo em estudo.

O produto da PCR necessita ser disposto em tubos, nos quais são adicionados endonucleases: Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau 3AI (Life Technologies GIBCO/BRL); e ocorre a clivagem (de acordo com as especificações técnicas informadas pelo fabricante), em seguida a solução é submetida a banho-maria, a 37°C por duas horas; ao final é adicionado 4 l de loading buffer(0,25% de azul de bromofenol, e 15% de Ficoll tipo 400); uma alíquota de 24 l deve ser submetida a eletroforese em gel de agarose 2%, sendo submetido a coloração; a visualização das bandas formadas ocorre por estímulos de luz UV; neste momento o pesquisador pode optar pela técnica de "Southern blot" ou pelo fotodocumentador, nesse caso, os resultados obtidos são comparados com a tabela padrão de Bernard et al. (1994) (KANESHIMA et al., 2008).

CAPTURA HÍBRIDA II

A técnica de captura híbrida (Digene Diagnostics Inc.) utilizada para detecção do HPV é um exame de biologia molecular altamente sensível, capaz de detectar aproximadamente 18 tipos de HPV (BIGIO, BARBOSA, CAVALCANTI, 2002; MOLINA, 2009).

Técnica molecular de Captura Híbrida II (Digene R) que avalia a presença de 18 tipos de HPV, divididos em dois grupos, conforme o risco ontogênico. Nesta técnica são utilizadas sondas, que consistem em moléculas de RNA complementares ao DNA. As moléculas complementares ou híbridos são, posteriormente, conjugados com anticorpos monoclonais que contém um fosfato alcalino. Esse material é lavado posteriormente, só permanecendo os anticorpos ligados ao RNA / DNA (ZAMPIROLO, MERLIN, MENEZES, 2007).

Um substrato quimioluminescente, que se liga ao fosfato alcalino, é misturado ao material e a leitura é realizada em um luminômetro, sendo a luz emitida em unidades relativas de luz que é comparada com o controle (RLU/PC). A sensibilidade do método é de 1 pg/ml de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus/célula. Por esta sensibilidade, o teste de Captura Híbrida é ao

mesmo tempo qualitativo e quantitativo.

MICROARRANJOS

A técnica de micro arranjos, é conhecida também como biochip ou chip de DNA, é frequentemente utilizada na análise de expressão gênica e análise de genomas funcionais. Em uma lâmina de vidro, de forma organizada e fixa, sequências de sondas de DNA com capacidade de se hibridizarem com a amostra, sendo isto possível devido o princípio da complementariedade e/ou semelhança em sequência genética (Guindalini, Tufik, 2001).

Na identificação do HPV, o sistema de micro arranjos possibilita determinar a presença de 24 tipos de HPV; dos quais nove são considerados de baixo risco (6,11,34,40,42,43,44,54,70) oncogênico e 15 são considerados de alto risco (16,18,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66). A amostra de células da cérvix, é submetida, inicialmente, a uma PCR convencional, para amplificação da região L1 pelo par de primers GP+. Como teste controle, é utilizado a B-globina, que também é amplificada. Os produtos da PCR devem ser submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e em seguida 10ul da amostra deverá ser desnaturada a temperatura de 95°C por cinco minutos, posteriormente adicionada solução de hibridização e disposta o material em lâmina.

O processo é realizado por 90 minutos, com uma temperatura de 43°C, em seguida é realizado lavagem e secagem. E, por fim, os dados obtidos serão analisados pelo sistema de scanner Chip DNA; e cada hibridização DNA-sonda corresponde a positividade para o tipo de HPV determinado. É importante ressaltar que as amostras que positivarem em gel de agarose e negativas no microarranjo são consideradas outros tipos de HPVs, ou seja, não corresponde à nenhum dos 24 tipos de HPVs do potencial de análise do sistema de microarranjos (CHOIA, 2005).

NESTED – PCR

A técnica de Nested PCR, possui a metodologia de amplificação de uma sequência de pares de bases presente em um fragmento previamente amplificado, diferentemente da PCR convencional, e o pesquisador terá que utilizar dois sistemas de primers diferentes.

A técnica de Nested – PCR é composta de dois momentos de realização de PCRs. No primeiro, usa-se o par de primers MY09/MY11, que se anela na região L1, produzindo um fragmento de 450pb; essa região será alvo da amplificação, pois é considerada a mais conservada do vírus HPV. São realizados 40 ciclos, nos quais, ocorrem as etapas, respectivamente: desnaturação, anelamento e extensão.

Após o final da primeira etapa, deve ser separado 2µl do produto obtido, o qual deve ser submetida a uma nova PCR, entretanto, esta se utiliza do par de primers GP5+/GP6+ que irá gerar um fragmento de 150 pb a partir do produto do primeiro round, aumentando, assim, o grau de especificidade da técnica. O produto final é

exposto a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a concentração de 8% (SIRIAUNKGUL, 2008).

Logo foi possível observar, no presente artigo, que existem várias metodologias experimentais para identificação genotípica do DNA do HPV, através de técnicas de biologia molecular. Cada metodologia possui suas características específicas, o que as diferencia, bem como pontos positivos e negativos de vantagens e desvantagens, ficando à critério do pesquisador a melhor técnica para ser utilizada. A tabela 1 apresenta as principais vantagens e desvantagens das técnicas aqui abordadas.

Tabela 1. Principais vantagens e desvantagens das técnicas para detecção do HPV

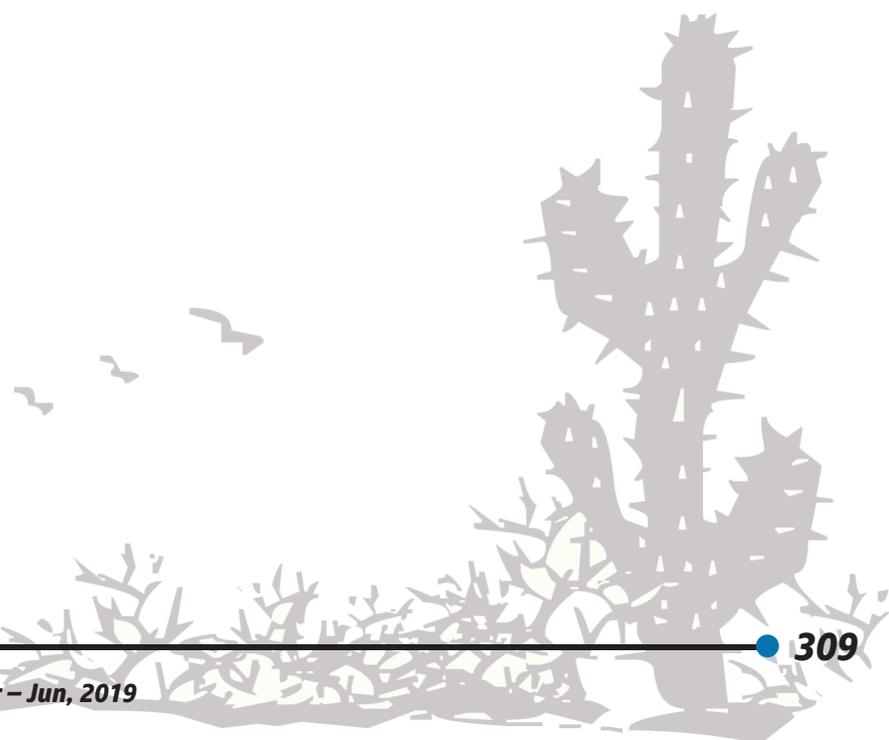
TÉCNICA	DESVANTAGEM	VANTAGEM
PCR convencional	Possibilidade de falha na amplificação decorrente de erro na extração do DNA ou ineficiência dos primers ¹² .	Grande capacidade de detecção de baixas cargas virais em células e tecidos; possibilidade de identificação de diversos tipos de HPV ¹² .
PCR em Tempo Real	Alto custo do equipamento de análise da amostra (softwares).	Baixo índice de contaminações de amostras; técnica de execução rápida (30 minutos), sendo considerada uma técnica sensível e eficiente (TAVARES <i>et al.</i> , 2007).
PCR – RFLP	Baixa sensibilidade em casos de múltiplos tipos de HPVs na amostra; não é possível identificação de todos os tipos de HPV de alto risco. Às vezes apresenta necessidade de utilização de diversas enzimas de restrição (KANESHIMA <i>et al.</i> , 2001).	Possibilidade de detecção de um grande número de tipos de HPVs é financeiramente vantajosa e de fácil manejo para o laboratório (KANESHIMA <i>et al.</i> , 2001).
CAPTURA HÍBRIDA	Capacidade de detecção apenas de grupos específicos de HPVs, utilização de cromógenos.	Alta sensibilidade para identificação de tipos específicos de DNA de HPV, principalmente os de alto risco (BIGIO <i>et al.</i> , 2002; MOLINA, 2009).
Microarranjos	Técnica de difícil acesso.	Detecta múltiplas infecções em uma mesma amostra (GUINDALINI, TUFIK, 2007).
Nested – PCR	Técnica de maior gasto de tempo por necessitar de duas etapas de PCR.	Possui alta sensibilidade, podendo apresentar 38% mais especificidade que a PCR convencional, e capacidade de identificação do DNA viral em amostras com infecções múltiplas (CARVALHO, 2010).

Fonte: próprio autor.

Conclusão

Foi possível observar que com a crescente evolução das técnicas de biologia molecular, na atualidade, existem várias técnicas que tornam possível a identificação genotípica do HPV. Dentre as técnicas abordadas nesta revisão, a Nested – PCR se apresentou mais eficiente que as demais. Devido à capacidade de identificação de DNA do HPV, o qual é submetido a dois “rounds” de PCR. Sendo assim, a aplicação desta técnica seria de

fundamental relevância para a detecção de pacientes que se encontram entre fatores de risco para infecções e desenvolvimentos de lesões e câncer ocasionados pelo HPV.



Referências

- PELLOSO SM, CARVALHO MDB, HIGARASHI IH. Conhecimento das mulheres sobre o câncer cérvico-uterino. *Acta Sci Health Sci* 2004; 26(2): 319-24.
- FRIGATO, S.; HOGA, L.A.K. Assistência a Mulher com Câncer do Colo Uterino: O Papel da Enfermagem. *Rev. Brasileira de Cancerologia*, São Paulo, v. 49, n. 4, 209-214, jul. 2003.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2011.
- QUEIROZ, S.A. de. Percepção de mulheres acerca do exame de prevenção do câncer cérvico-uterino. *REBES (Pombal – PB, Brasil)*, v. 3, n. 1, p. 11-16, jan.-mar., 2013
- SANTOS, M. S.; MACEDO, A. P. N.; LEITE, M. A.G. Percepção de Usuárias de uma Unidade de Saúde da Família Acerca da Prevenção do Câncer do Colo do Útero. *Rev. APS, Juiz de Fora*, v. 13, n. 3, 310-319, jul./set. 2010.
- SOARES, M. C et al. Câncer de colo uterino: atenção integral à mulher nos serviços de saúde. *Rev. Gaúcha Enferm.*, Porto Alegre (RS) 2011 set; 32(3): 502-8.
- MURTA, G.F. Saberes e Prática: guia para ensino e aprendizado de enfermagem. 5. ed. Vol. 4. São Paulo: Difusão Editora. 2009.
- QUEIROZ, S.A. de. Percepção de mulheres acerca do exame de prevenção do câncer cérvico-uterino. *REBES (Pombal – PB, Brasil)*, v. 3, n. 1, p. 11-16, jan.-mar., 2013
- OLIVEIRA, M.; PINTO, I.C. Percepção das usuárias sobre as ações de prevenção do câncer do colo do útero nas estratégias saúde da família em uma Distrital de saúde do município de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Saúde Materno Infantil*, n. 7, 31-8, 2010.
- FERREIRA, M.L.S.M. Influence reasons that inhibit women from doing Papanicolaou test. *Esc Anna Nery Rev Enferm*; 13 (2): 378-84; abr-jun, 2009
- ASSUNÇÃO, J.G.F.; CORREIA, A.K.A. Análise comparativa das técnicas de biologia molecular para genotipagem do papiloma vírus humano – HPV. *Revista Científica da Escola da Saúde*; Ano 3; nº 2, abr-set, 2014.
- CARVALHO N.O., CASTILLO D.M., PERONE C, JANUARIO J.N., MELO V.H., FILHOS GBL. Comparison of HPV genotyping by type-specific pcr and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2010 fev; 105 (1): 73-78.
- HASENACK B.S., MIQUELÃO A.K.M., MARQUEZ; PINHEIRO E.H.T., URNAU AP. Estudo comparativo dos diagnósticos de vaginose bacteriana pelas técnicas de Papanicolaou e Gram. *Revista Brasileira de Análise Clínica-RBAC*. 2008.
- MAGALHAES I.M., et al. Comparação de dois pares de oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase para detecção de Papilomavirus humanos em esfregaços cervicais. *DST – J bras Doenças SexTransm*. 2008; 20(2): 93-98.
- BROCCOLO F, COCUZZA C.E. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by a real-time PCR-based system. *Elsevier*; 2007.
- KANESHIMA EN, BIDOIA CCG, GABRIEL M, SUZUKI LE, CONSOLARO MEL. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. *Acta Scientiarum*; Maringá, 2001; 23(3): 731-737.
- GUINDALINI C, TUFIK S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica – aplicação no estudo de fenótipos complexos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007; 29(4): 370-4.
- CHOIA YC, JUNG W, NAM J, CHOI H, PARK C. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. *Elsevier-Gynecologic oncology*. 2005 set; 98(3): 369-375.
- SIRIAUNGKUL, S.; SUWIWAT, S.; SETTAKON, J.; KHUNAMORNPOONG, S.; TUNGSINMUNKONG, K.; BOONTHUM, A.; HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. *Elsevier-Gynecologic oncology*. 2008.

TAVARES SBN, AMARAL RG, MANRIQUE EJC, SOUSA NLPA, ZEFERINO LC. Controle de qualidade em citopatologia cervical. Revista Brasileira de Cancerologia 2007; 53(3): 355-364.

BIGIO, CT.; BARBOSA, F. A.; CAVALCANTI, SMB. Detecção e tipagem viral para papilomavírus humanos: progressos recentes e perspectivas clínicas. DST J Bras Doenças Sex Transm, v. 14, n. 4, p. 32-35, 2002.

DST – J. Brás. Doenças Sex. Transm. 2002; v.14, n. 4: 32-5.

Molina AT, P.R. Biologia molecular. Atualização. 2 ed. São Paulo: Einstein; 2004.

ZAMPIROLO, J.A.; MERLIN, J.C.; MENEZES, M.E. Prevalence of HPV of low and high-risk for the technique of molecular biology (Hybrid captures II®) in Santa Catarina. RBAC, vol. 39(4): 265-268, 2007.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Recebido em: 25/04/2019

Aprovado em: 28/06/2019