

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO POR PCR EM UM  
LABORATÓRIO DA REGIÃO METROPOLITANA DA GRANDE VITÓRIA**  
***MOLECULAR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS BY PCR IN A  
LABORATORY IN THE METROPOLITAN REGION OF GRANDE VITÓRIA***

Giovana Trajane Sales<sup>1</sup>

Alexandra Boutros Chamoun Del Piero<sup>2</sup>

**RESUMO:** O Papilomavírus humano conhecido como HPV é uma doença sexualmente transmissível frequente em todo mundo. Ele infecta o epitélio de seres humanos, podendo persistir de forma assintomática ou causar neoplasias. Visando isso a técnica da biologia molecular PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) determina a presença desse vírus mesmo em pacientes assintomáticos, podendo separá-los em alto e baixo risco. O presente estudo buscou ilustrar a prevalência dos casos de HPV por meio de uma pesquisa quantitativa descritiva em um laboratório da região metropolitana da Grande Vitória no período de janeiro a junho de 2023 através da técnica PCR da biologia molecular apresentando dados sobre o diagnóstico molecular do HPV e como isso contribui no diagnóstico precoce, tratamento e acompanhamento do paciente. Foram obtidos 280 resultados de infecção por HPV positivos dos 592 resultados. Dentre os subtipos alto risco para HPV o 16 foi o mais encontrado (4,1%), seguido do 18 (3,5%) e 35 (3,0%). Já entre os de baixo risco tivemos o 6 (3,7%), seguido do 11 com (3,2%) e 43 (2,5%). Obtivemos também pacientes que apresentaram infecção com mais de um subtipo de HPV, sendo eles (16,4%). Em conclusão como confirmado pela literatura, os subtipos de HPV de alto risco oncogênico foram encontrados em grande maioria sendo 123 pacientes contra 74 de baixo risco.

**Palavras-chave:** HPV; PCR; Diagnóstico.

**ABSTRACT:**

The human papillomavirus known as HPV is a common sexually transmitted disease worldwide. It infects the epithelium of human beings and can persist asymptotically or cause neoplasms. With this in mind, the molecular biology technique PCR (polymerase chain reaction) determines the presence of this virus even in asymptomatic patients, being able to separate them into high and low risk. The present study sought to illustrate the prevalence of HPV cases through descriptive quantitative research in a laboratory in the metropolitan region of Greater Vitória from January to June 2023 using the molecular biology PCR technique, presenting data on the molecular diagnosis of HPV. and how this contributes to early diagnosis, treatment and patient monitoring. There were 280 positive HPV infection results obtained out of 592 results. Among the high-risk subtypes for HPV, 16 was the most found (4.1%), followed

---

<sup>1</sup> Centro Universitário Salesiano – Unisales. Vitória/ES, Brasil.

<sup>2</sup> Centro Universitário Salesiano – Unisales. Vitória/ES, Brasil.

by 18 (3.5%) and 35 (3.0%). Among those at low risk, we had 6 (3.7%), followed by 11 with (3.2%) and 43 (2.5%). We also obtained patients who were infected with more than one subtype of HPV, namely (16.4%). In conclusion, as confirmed by the literature, the high oncogenic risk HPV subtypes were found in the vast majority, with 123 patients compared to 74 low risk.

**Keywords:** HPV; PCR; Diagnosis.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar da sensibilidade e eficácia do teste de PCR para diagnóstico de triagem do HPV, a necessidade de se conhecer os fatores epidemiológicos ainda precisam ser mais explorados nos laboratórios pois as vezes pela questão do custo, nem todos os investem nessa técnica avançada e moderna, porém ela é de extrema importância porque é capaz de detectar todos os subtipos desse vírus. Nesse contexto, o presente trabalho se faz importante pois demonstra que o HPV é uma doença bastante recorrente no Brasil, com uma alta prevalência de casos, sendo noticiados nos jornais quase todos os dias. São utilizados diferentes tipos de amostras diariamente dentro dos laboratórios de biologia molecular para os casos de HPV como por exemplo: amostras vaginais, anais, retais e uretrais sendo utilizados diferentes tipos de abordagens para cada uma delas (Ministério da Saúde, 2014).

E observando esses diferentes tipos de amostras diariamente há a necessidade de analisar essa prevalência de alto e baixo risco, que só são detectados pelo método PCR, capaz de identificar os subtipos do vírus encontrados nos resultados positivos, visto que dentre os vários tipos de HPV, os tipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos casos de câncer do colo do útero, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum na população mundial feminina, em torno de 16.370 para cada ano do biênio 2018-2019, representando 8,1% de todas as mortes femininas por esta doença. Dessa forma ao estimar a epidemiologia dessa patologia na população e descrevendo seus dados sociodemográficos é possível proporcionar um melhor entendimento da população afetada auxiliando assim a prevenção e o tratamento precoce do HPV (Dubiel, 2012).

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus que pertence ao grupo dos papovavírus. Atualmente são conhecidas mais de 100 espécies, 45 das quais podem infectar os órgãos genitais. Eles são classificados em dois grupos de acordo com seu potencial carcinogênico. Espécies de alto risco carcinogênico, em conjunto com outros cofatores, estão associadas ao aumento de neoplasia intraepitelial e câncer do colo do útero, vulva, vagina e região anal (Kenne et al, 2014).

Ele é o agente causal de muitas doenças epiteliais e de mucosas, entre elas estão as verrugas genitais, as quais são consideradas a doença mais comum ocorrente entre a população sexualmente ativa, e também o tipo mais comum de câncer em mulheres, o cervical, causado por infecções persistentes por genótipos de HPV de alto risco oncogênico. O câncer cervical é o mais comum nos países em desenvolvimento e umas das principais causas de morte por câncer entre as mulheres (Silva et al, 2015) (Kenne et al, 2014).

Na década de 1990, vários estudos foram realizados com técnicas de biologia molecular, revelando incontestavelmente um papel causal de alguns tipos de HPV no câncer cervical, sendo de agora em diante cancerígenos, por isso foi usado

rotineiramente como teste molecular para o HPV durante os dois primeiros anos do novo milênio no tratamento de pacientes com lesões cervicais e introdução de vacinas profiláticas (Ferreira; Moraes, 2021).

Técnicas baseadas em amplificação de ácidos nucleicos, principalmente PCR, inovaram a compreensão da epidemiologia do câncer cervical. Logicamente, esses métodos de diagnóstico e tratamento dessa doença estão melhorando. Inicialmente, foram utilizados métodos internos desenvolvidos nos próprios laboratórios analíticos, muitas vezes com boa sensibilidade, mas difíceis de comparar entre laboratórios. Como as mulheres são infectadas pelo HPV e não apresentam consequências clínicas, e a maioria das infecções são transitórias e assintomáticas, a correlação clínica geralmente é baixa devido à alta sensibilidade. Outras vantagens do teste baseado em PCR incluem a capacidade de usar diferentes tipos de amostras biológicas, como biópsias, células esfoliadas, tumores e câncer cervical (Ferreira; Moraes, 2021; Ministério da Saúde, 2014).

A biologia molecular atualmente está consagrada na pesquisa do DNA de HPV e, entre as técnicas disponíveis, a PCR em tempo real destaca-se por apresentar sensibilidade e valor preditivo negativo elevados. O método detecta individualmente os tipos 16 e 18, além de informar, de modo agrupado, a presença de outros 12 tipos de HPV de alto risco oncogênico. Na prática clínica, o teste para esses tipos de HPV pode ser utilizado como adjunto à colpocitologia para o rastreamento de câncer de colo do útero em mulheres com idade igual ou superior a 30 anos. A carga viral reflete a quantidade de células presentes na amostra, ou seja, depende das condições de coleta, e não se relaciona de modo preciso com a intensidade da infecção pelo HPV. Ela pode também ser influenciada pela reinfecção por novos tipos virais e pelo grau de integração no genoma do hospedeiro. Dessa forma, a quantificação da carga viral não pode ser considerada um meio eficaz de controle de tratamento ou prognóstico (Dubiel, 2012).

O objetivo principal deste trabalho é demonstrar a prevalência do HPV de janeiro a junho de 2023 identificados através do método PCR em um laboratório da região metropolitana da Grande Vitória apresentando dados sobre o diagnóstico molecular de HPV por PCR e como isso pode contribuir no diagnóstico precoce, tratamento e acompanhamento do paciente, juntamente com uma avaliação crítica sobre uso desse método como uma ferramenta confiável e precisa para detectar a presença do Papilomavírus Humano (HPV) no organismo humano. Através dessa análise, busca-se contribuir para o avanço da pesquisa em doenças virais, especialmente o HPV, identificando possíveis problemas e limitações associados ao método e destacando sua importância para o diagnóstico precoce e preciso da infecção por HPV, o que é crucial para a prevenção de cânceres relacionados. E os objetivos específicos são: Analisar o desempenho do método PCR no diagnóstico molecular do HPV em comparação com outras técnicas disponíveis, identificar as limitações do PCR no diagnóstico molecular do HPV e possíveis soluções e para essas limitações e investigar o potencial do PCR como ferramenta de triagem para o HPV em populações de alto risco e na prevenção do câncer cervical.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO: ESTRUTURA VIRAL E GENÔMICA**

O HPV (Papilomavírus Humano), pertencentes a família *Papilomaviridae* são DNA vírus, com genoma de fita dupla epiteliotrópicos (que infectam pele e mucosas) pequenos e não envelopados com revestimento de capsídeo, forma icosaédrica contendo 72 capsômeros que estabelecem infecções produtivas no epitélio estratificado da pele, no trato anogenital e na cavidade oral. Ele é um tipo de DNA-vírus que dependendo da sua propensão de infecção tecidual infecta pele ou mucosas (oral, genital e anal), de vários locais do corpo, se manifestando em forma de verrugas comuns ou genitais e anais causando lesões na pele ou câncer dependendo do tipo viral (Nogueira, Reis, 2022; Meneses; Toralles; Mendes, 2019).

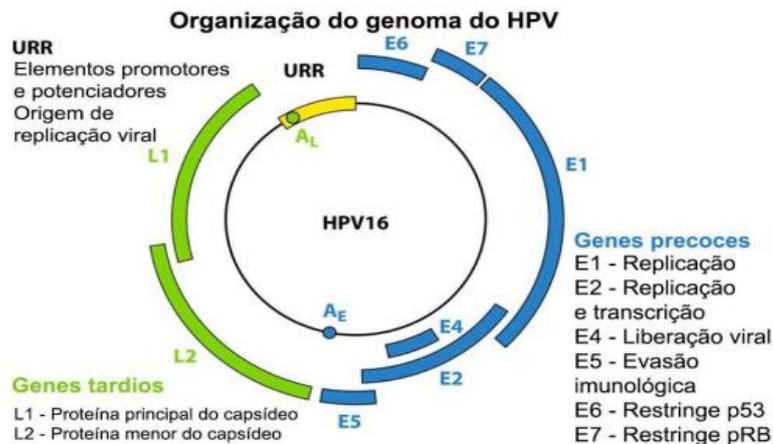
## 2.2 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DOS PAPILOMAVÍRUS

Os capsômeros são formados pela proteína capsídica maior L1 e proteína capsídica menor L2, porém a proteína L1 possui um pequeno looping (repetição infinita) que consegue se expor para fora do capsídeo, dessa forma esse looping consegue reconhecer os antígenos, fazendo um reconhecimento do sistema imunitário da partícula viral. O DNA do genoma do *Papilomavírus* possui tanto regiões gênicas quanto regiões regulatórias da expressão gênica. Nas regiões gênicas se encontram tanto os genes precoces (E1, E2, E4, E5 e E6) que são expressos no começo da infecção viral, quanto os genes tardios (L1 e L2). O gene E1 possui uma atividade helicásica (helicase) ATP dependente que é necessário para o reconhecimento do material genético viral e o início da sua síntese (replicação). Já o gene E2 regula os genes precoces de formas diversas de acordo com a sua concentração, estimulando ou inibindo dependendo da necessidade (Castro et al, 2009; Silva et al, 2015).

Quando essa proteína E2 está baixa ela vai estimular a transcrição dos genes precoces, e quando a concentração estiver acima do determinado nível ela inverte a função, inibindo a síntese desses genes, como consequência também vai inibir os genes E6 e E7 que são as principais proteínas oncogênicas desse vírus. Além do gene E4 não menos importante responsável pela coilocitose, que é uma lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL). Defesas imunológicas fracas são talvez o fator mais importante no desenvolvimento de infecções por HPV em outras partes do corpo. Além da IgA, a cavidade oral contém enzimas proteolíticas que atuam como proteção contra a infecção pelo HPV (Castro et al, 2009; Silva et al, 2015).

Nos humanos, nos quais foram e são mais intensamente estudados, os HPV podem ser divididos, pelo aspecto clínico, em três grupos: HPV associado a verrugas cutâneas (gamapapilomavírus), HPV associado a mucosa anogenital (alfapapilomavírus) e HPV associados a lesões cutâneas de portadores de epidermodisplasia verruciforme, uma doença rara de base hereditária (betapapilomavírus) (Ferreira, 2021). Conforme ilustrado na figura um, pode se observar o que foi falado no texto anterior, mostrando a organização genômica do HPV.

Figura 1: Organização genômica de um tipo do HPV



Fonte: ALMEIDA, 2019

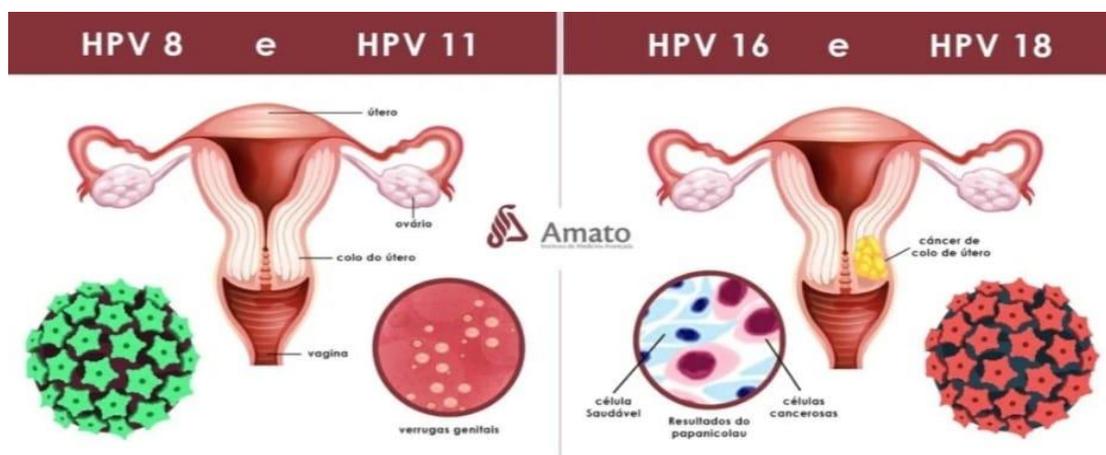
### 2.2.1 Tipos de HPV

Existem mais de 150 tipos de HPV. Desses tipos aproximadamente 40 podem causar infecção no trato genital, sendo 14, os de maior risco, já que podem provocar câncer de maior potencial oncogênico. Na maioria das vezes a infecção pelo HPV é passageira, regredindo espontaneamente. Entretanto nos casos em que ela persiste, e se for causada por um desses tipos com maior propensão pra câncer, pode se desenvolver as chamadas lesões precursoras, que são como o próprio nome diz vêm antes, e se não forem identificadas e tratadas podem progredir pra câncer, principalmente pro colo de útero, mas também podem desencadear com menos frequência mas pode, câncer de vagina, de vulva, de pênis, ânus, orofaringe e boca (Castro et al, 2008).

A manifestação pelo HPV pode se apresentar de duas formas: clínica e subclínica. As lesões clínicas são chamadas verrugas ou condiloma acuminado, popularmente as pessoas chamam de “crista de galo”, “figueira”, tendo um aspecto vegetante semelhante a uma “couve-flor”, podendo surgir no colo do útero, na vagina, em torno do ânus ou no próprio ânus, no pênis, na bolsa escrotal, entre outros, e essas lesões. São encontradas no HPV de baixo risco sendo eles: 6, 11, 41, 43 e 44. Já os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 são considerados de alto risco, que fazem parte das lesões subclínicas, que são aquelas não visíveis a olho nu (Instituto Nacional do Câncer, 2018; Castro et al, 2008).

No colo do útero essas manifestações são chamadas de lesões intra-epiteliais de baixo grau ou neoplasia intra-epitelial grau I, essas lesões refletem apenas a presença do vírus, mas podem ocorrer também as lesões intra-epiteliais de alto grau ou neoplasia intra-epitelial graus II ou III (NIC II ou III), essas são as chamadas lesões precursoras e que merecem grande atenção por se tratarem de carcinomas (tumores malignos). Todos os tipos de HPV de importância para a etiologia do câncer cervical em humanos estão contidos no gênero dos alfapapilomavírus, em que se destacam os HPV 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% de todos os tumores dessa localização anatômica no mundo. Os tipos de HPV diferem no tropismo tecidual, associação com diferentes lesões e potencial oncogênico (Instituto Nacional do Câncer, 2018; Castro et al, 2008). Conforme ilustrado na figura 2, conseguimos ver exemplos de como um HPV de alto e baixo risco se manifesta no corpo.

Figura 2: HPV de alto e baixo risco



Fonte: Instituto Amato, 2023

### 2.2.2 Carga viral e infecções múltiplas

A carga viral do HPV continua sendo um tema altamente controverso. Vários estudos encontraram gradientes de carga viral maiores em lesões mais avançadas, mas essa associação se perde nas extremidades mais preocupantes do espectro: carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Isso ocorre porque os carcinomas requerem a expressão de E6/E7 para manter a transformação celular, mas a replicação viral é muito baixa ou inexistente (Ferreira; Moraes, 2021).

Também existem dados conflitantes sobre o papel de infecções múltiplas, ou seja, coinfeção com vários tipos de HPV. Vários estudos mostraram que essas infecções múltiplas aumentam o risco de pacientes desenvolverem neoplasias em comparação com pacientes com um único tipo de infecção. No entanto, outros estudos confirmaram que infecções múltiplas são mais comuns em mulheres assintomáticas do que lesões em que geralmente apenas um tipo de HPV é detectado. Esses resultados sugerem que, embora as lesões intraepiteliais sejam de origem clonal, derivadas de uma única célula imortalizada por um único tipo de vírus, a infecção polimórfica é de fato um marcador de resposta imune deficiente à infecção pelo HPV. Mais uma vez, as questões técnicas desempenham um papel importante neste debate, pois métodos mais eficientes para identificar infecções múltiplas só se tornaram disponíveis nos últimos anos (Ferreira, Moraes, 2021).

## 2.3 DIAGNÓSTICO

O exame mais utilizado no diagnóstico e prevenção do HPV é o bastante conhecido Papanicolau ou Exame preventivo de colo de útero, que também pode ser chamado de exame cervicovaginal ou colpocitologia oncótica cervical que detecta as alterações causadas por ele nas células do colo do útero e não o vírus propriamente dito, juntamente com uma biópsia, que fornece o diagnóstico histológico, e que tem sido

realizado em laboratórios de patologia ao longo dos últimos 50 anos. No entanto, para identificação do DNA e tipagem dos possíveis tipos de HPV, diferentes técnicas moleculares são empregadas, baseadas em hibridizações, tais como: teste de hibridização molecular, que é a técnica mais sensível (95-100%) de detecção da infecção; a hibridização *in situ* (ISH), que detecta a presença do material genético do agente (DNA ou RNA) diretamente em cortes histológicos de tecidos; a técnica da captura híbrida, que utiliza sondas de RNA e tem a capacidade de detectar 18 dos aproximadamente 30 tipos de HPV que normalmente infectam o trato anogenital; o *microarray* (microarranjos), técnica de hibridização que permite a investigação da expressão gênica, analisando vários genes ao mesmo tempo (Meneses; Toralles; Mendes, 2019; Nogueira; Reis, 2022).

Segundo Rodrigues et al. (2009), um avanço significativo na tecnologia de PCR é um método que permite aumentar a amplificação do DNA não apenas no final (PCR convencional), mas também em cada ciclo (incluindo quantidades crescentes dos primeiros 30 ciclos para 40 ciclos). A PCR é atualmente a técnica mais sensível, capaz de detectar 10-100 moléculas de DNA viral por amostra para definir genótipos relevantes em casos de infecções múltiplas devido à geração de padrões de restrição perturbados. As patentes de PCR da Perkin levaram ao desenvolvimento de automação que controla e regula a temperatura, permitindo que as proteínas sejam aquecidas e resfriadas alternadamente, então você verá o termociclador, aparelho que faz a PCR.

### 2.3.1 Método PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica de biologia molecular onde ocorre uma síntese de ácidos nucleicos mais comumente usada para detecção de vírus, especialmente em situações em que a quantidade de DNA disponível é baixa. Essa técnica, utilizada para localizar o HPV é considerada padrão-ouro devido à sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez de análise, sendo considerada o melhor método para o diagnóstico eficiente do HPV. A PCR é caracterizada pela amplificação de uma quantidade reduzida da sequência de DNA alvo em um milhão de vezes. Requer sistemas iniciadores chamados *primers* que nada mais são do que sequências únicas de nucleotídeos, capazes de se anelar às suas sequências alvo de DNA durante a PCR, específicos para cada região a ser amplificada, são desenhados baseando-se no código genético (DNA molde) da espécie que se deseja estudar, nesse caso o HPV, sendo mais comumente usados os consensuns MY09/MY11 e GP5+/GP6+ (Meneses; Toralles; Mendes, 2019).

A PCR convencional tem a vantagem de detectar cargas virais muito baixas em células e tecidos e ter grande potencial para identificar muitos tipos de HPV. Por outro lado, ineficiências de primer ou erros de extração de DNA podem levar a erros de amplificação. Usando PCR convencional com polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), aproximadamente 40 tipos de HPV podem ser detectados. Esta técnica utiliza enzimas de restrição para genotipagem viral. O RFLP-PCR não identifica todos os tipos de HPV de alto risco, por ter menor sensibilidade quando as amostras estão infectadas com vários tipos de HPV (Ferreira, Moraes, 2021).

Figura 3: PCR dos conjuntos A e B do HPV sendo realizado



Fonte: Autoria Própria, 2023

O desenvolvimento de técnicas de amplificação de segmentos de DNA por PCR ampliou os horizontes de diversas áreas do conhecimento. Atualmente existem as seguintes técnicas de genotipagem do HPV: Hibridação *in situ* (ISH), detecção de híbridos, PCR convencional, PCR-RFLP, *nested* PCR, PCR em tempo real, as várias técnicas de detecção de HPV disponíveis variam amplamente em sensibilidade e especificidade (Menêses, Toralles, Mendes, 2019).

A discriminação completa de mais de 40 tipos de HPV também pode ser demonstrada por hibridização *dot blot* usando múltiplas sondas específicas do tipo. *Microarrays*, também chamados de biochips, são frequentemente usados para análise de expressão gênica e análise de genômica funcional. Nesta técnica, as sequências das sondas são imobilizadas em uma lâmina de forma organizada (*in vitro*) e podem hibridizar a uma amostra pelo princípio da complementaridade ou similaridade das sequências. Ao detectar o HPV, o biochip pode determinar a presença de 24 tipos de HPV. Destes, 9 são considerados de baixo risco de câncer e 15 são considerados de alto risco. *Nested* PCR é mais sensível e específico do que outras técnicas, 38% mais específico do que o PCR convencional. Essa técnica, ao contrário da PCR convencional, baseia-se no princípio de usar dois conjuntos de *primers* diferentes para amplificar sequências presentes em fragmentos previamente amplificados (Ferreira, Moraes, 2021).

A PCR consiste em duas fases de endurecimento, primeiro, o par de primers MY09/MY11 é usado. Isso forma um loop na região L1 e produz um fragmento de 450 pb que é reamplificado na região alvo. Isso ocorre porque acredita-se que seja o mais conservado dos vírus HPV. Quarenta ciclos são executados durante os quais a

próxima etapa é executada. Desnaturação, anelamento e extensão para identificar o DNA viral em amostras com infecções múltiplas. Após a primeira amplificação, o produto obtido nesta etapa é submetido a outra PCR, mas utilizando o par de primers GP5+/GP6+ para gerar um fragmento de 150 pb a partir do produto da primeira execução, aumentando assim o grau de especificidade da tecnologia. O produto final é concluído usando a tecnologia de eletroforese em gel de poliacrilamida (Nogueira; Reis, 2022; Meneses; Toralles; Mendes, 2019).

Figura 4: Amostras de PCR colocadas no aparelho para leitura de resultados



Fonte: Autoria Própria, 2023

A tecnologia de PCR tem mostrado alta sensibilidade na identificação de DNA viral presente em vários tipos de espécimes clínicos, não apenas de lesões pré - neoplásicas, mas também de infecções latentes ou subclínicas associadas a esse patógeno viral. Além da detecção do DNA do HPV por técnicas de PCR, é importante identificar os tipos de HPV presentes em amostras clínicas de mucosa infectada para poder determinar se o risco de câncer é alto ou baixo. No entanto, a capacidade de fazê-lo é limitada em comparação com kits disponíveis comercialmente em uso rotineiro. Essa identificação também nos permitirá determinar o tratamento mais adequado para pacientes com essa infecção viral (Nogueira; Reis, 2022).

Segundo Rodrigues et al. (2009), um avanço significativo na tecnologia de PCR é um método que permite aumentar a amplificação do DNA não apenas no final (PCR convencional), mas também em cada ciclo (incluindo quantidades crescentes dos primeiros 30 ciclos para 40 ciclos). A PCR é atualmente a técnica mais sensível, capaz de detectar 10-100 moléculas de DNA viral por amostra para definir genótipos relevantes em casos de infecções múltiplas devido à geração de padrões de restrição perturbados. As patentes de PCR da Perkin levaram ao desenvolvimento de automação que controla e regula a temperatura, permitindo que as proteínas sejam aquecidas e resfriadas alternadamente, então você verá o termociclador, aparelho que faz a PCR.

### 2.3.2 Hibridização *in situ* (ISH)

A hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica onde as sondas de DNA podem ser usadas para determinar a localização cromossômica de uma alteração. Esse nome é derivado do fato de que o DNA (ou RNA) é visualizado enquanto está na célula (*in situ*) e requer que as células sejam fixadas e os cromossomos sejam espalhados em uma lâmina de microscópio e desnaturados. Porém é considerada menos sensível pois só detecta o vírus quando mais de 10 cópias de DNA viral estão presentes por célula. A hibridização *in situ* é uma técnica que permite a detecção de sequências específicas de DNA ou RNA em seções de tecido ou células. Ele usa sequências complementares de DNA ou RNA dentro de uma fita simples marcada para formar uma “sonda” que pode ser clonada em DNA ou RNA ou oligonucleotídeos sintéticos. A sonda estabelece ligações de hidrogênio (pontes entre átomos de hidrogênio e átomos fortemente eletronegativos, como oxigênio, flúor ou nitrogênio) com DNA ou RNA alvo complementar em tecidos ou células e anexa marcadores radioativos (<sup>32</sup>P, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S e <sup>3</sup>H), ou não radioativos (peroxidase, biotina, digoxigenina), ou por corantes fluorescentes (fluoresceína, rodamina, cianina, entre outros), sendo este último uma característica da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Meneses, Toralles, Mendes, 2019).

### 2.3.3 PCR em tempo real (RT-PCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma variante do modo tradicional, cujo princípio se baseia na amplificação de cadeias de DNA "in vitro", que podem ser reforçadas várias vezes, fornecendo assim DNA suficiente para várias análises. Um único pedaço de DNA pode replicar milhões de cópias. A metodologia permite a quantificação do vírus por emissão de fluorescência uma vez que o DNA viral é amplificado. Esse método também pode identificar o vírus e quantificá-lo medindo sua carga viral. No entanto, determinando a relação E2/E6 por qPCR, é possível determinar a morfologia física do vírus dentro da célula hospedeira. Os métodos de PCR e qPCR são usados em pequena escala, limitam-se à pesquisa e não ao uso clínico e ainda não são considerados métodos complementares para o diagnóstico (Castro et al, 2018; Silva et al, 2015).

O desenvolvimento da técnica de PCR convencional em direção à técnica de PCR em tempo real agrega uma série de vantagens como: a redução de tempo e a facilidade de executar, eliminando completamente o uso de reagentes tóxicos (ex: brometo de etídio). Comparada à PCR convencional, essa técnica mantém características de sensibilidade, além de aumentar a especificidade e a precisão na quantificação de produtos de amplificação de uma amostra desconhecida. Essas vantagens são resultado de um sistema que detecta DNA amplificado, em “tempo real”, o que não requer muita manipulação durante a preparação das reações de amplificação, que são potenciais fontes de variabilidade (Dubiel, 2012).

A concentração dos amplicons aumenta com cada ciclo de amplificação, aumentando assim a emissão de fluorescência. Ao apresentar os resultados da amplificação em um sistema cartesiano com a intensidade de emissão no eixo horizontal (eixo X) e o número de ciclos no eixo das ordenadas (eixo Y), obtemos uma curva que fornece informações sobre a quantidade de DNA amplificado e progressão do ciclo de

amplificação. Fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos. Os sistemas de detecção de PCR em tempo real usam essas moléculas para monitorar a reação ao longo do ciclo. Os compostos fluorescentes mais utilizados são o SYBR® Green e as sondas de nucleotídeos marcados com fluoróforos, TaqMan®, marca registrada da Applied Biosystems (Novais; Pires-Alves, 2004).

#### **2.3.4 Análise de Polimorfismo de Restrição (PCR-RFLP)**

A *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) é uma técnica que usa enzimas de restrição para a genotipagem viral. Na PCR-RFLP, o DNA é amplificado por uma PCR convencional, seguida de um processo de clivagem por sítios de restrição específicos. Os polimorfismos observados com as técnicas de RFLP ocorrem porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos possui diferentes sequências de nucleotídeos ao longo das fitas. A presença ou ausência de sequências específicas de 4 a 8 pares de bases que são reconhecidas e cortadas por enzimas de restrição pode variar de pessoa para pessoa, resultando em polimorfismos. Durante o corte com enzimas de restrição, o DNA desses indivíduos é cortado no local de restrição, resultando em fragmentos de tamanhos diferentes. A base genética dos polimorfismos observados resulta de mutações, deleções e rearranjos entre locais de restrição (Meneses; Toralles; Mendes, 2019; Nogueira; Reis, 2022).

#### **2.4 AVANÇOS NAS TÉCNICAS MOLECULARES DO HPV**

A descoberta da ligação entre câncer e papilomavírus (HPV) permitiu avanços tecnológicos significativos, incluindo o desenvolvimento de testes moleculares. As técnicas de biologia molecular determinam a presença de vírus mesmo em pacientes sem sintomas, podem separá-los em alto grau e baixo risco. Portanto, eles são muito úteis na identificação de mulheres com a possibilidade de desenvolver lesões pré-cancerosas, contribuir para o combate ao câncer do colo do útero, utilizado como todo suplemento na tomada de decisão sobre suporte, cuidado e tratamento de pacientes feridos por HPV, especialmente em casos controversos. No entanto, embora progresso, este tipo de cancro continua a ser uma das principais causas de morte em mulheres em todo o mundo. Por esta há uma busca constante por novas alternativas diagnósticas precoce. A aplicação de técnicas de biologia molecular tem permitindo uma melhor compreensão dos eventos genéticos contribuir para o câncer, crescimento de tumores, invasão e metástase em diferentes tipos de câncer (Silva et al, 2015).

No início dos anos 80, o médico alemão Harald Zur Hausen publicou os primeiros estudos sobre hibridização molecular usando sondas de RNA de verrugas plantares. Isso permitiu que vários genótipos de HPV existentes fossem distinguidos com base na sequência de DNA. Ainda nessa década, Zur Hausen e colegas isolaram o DNA do papilomavírus humano de verrugas genitais e papilomas laríngeos. O DNA viral presente na laringe demonstrou ser semelhante ao do câncer cervical. Esta descoberta isolou o HPV 16 do material de biópsia em 50% dos casos de câncer cervical. O mesmo grupo posteriormente isolou o DNA do HPV-18 de outros 20% dos cânceres cervicais. A descoberta de que diferentes genótipos de HPV contribuem para a formação de tumores cancerígenos fortaleceu a pesquisa nessa área e tem

importância crescente na medicina. Assim, foi estabelecida uma associação entre a presença do HPV e o câncer do colo do útero (Rocha, 2016).

O século XX viu o desenvolvimento da biologia molecular graças à descoberta da estrutura do DNA (1953), da tecnologia do RNA recombinante (1970) e de novas técnicas e dispositivos que automatizaram o processo de sequenciamento do genoma dos organismos (1995). Na década de 1980, a tecnologia PCR foi descrita por Kary Mullis, que ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1993. O prêmio foi concedido em conjunto com o canadense Michael Smith (1932). Mullis ganhou um prêmio por inventar a reação em cadeia da polimerase (PCR), e Smith desenvolveu uma técnica conhecida como mutagênese dirigida ao local e a aplicou ao estudo de proteínas. Os avanços na técnica de Smith são a identificação de polimorfismos de nucleotídeos (modificações genéticas) que também podem ser realizados por PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), ou seja, análise de dissociação ou curvas de fusão (fusão de alta resolução (HRM)). A análise é derivada de produtos amplicon amplificados e é realizada automaticamente após termo ciclagem por PCR em tempo real para detectar mutações na sequência alvo. A partir daí, foram desenvolvidas variações da técnica que permitem avanços importantes na biologia molecular, principalmente na detecção do HPV (Meneses, Toralles, Mendes, 2019).

## 2.5 SINAIS, SINTOMAS E PREVENÇÃO

A infecção pelo HPV é assintomática na maioria das pessoas. Em alguns casos, o HPV pode permanecer adormecido por meses ou anos sem apresentar sintomas (visíveis a olho nu) ou pode apresentar sintomas assintomáticos (invisíveis a olho nu). Quando a pessoa passa por algum processo de diminuição da imunidade, da resistência do organismo, ocorrendo a multiplicação viral do HPV e ele se manifesta na forma de lesões mesmo que esta pessoa esteja a muito tempo sem ter relações sexuais. Em aproximadamente 24 meses a maioria das infecções em mulheres, principalmente em jovens até 18 anos desaparece sozinha. Os primeiros sintomas da infecção pelo HPV aparecem após cerca de 2 a 8 meses, mas pode levar até 20 anos para que os sinais de infecção apareçam. Os sintomas são geralmente mais comuns em mulheres grávidas e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (Ministério da Saúde, 2014).

A infecção pelo HPV é difícil de prevenir porque ocorre através do contato entre a pele doente e saudável, e não através da ejaculação. Portanto, preservativos devem ser sempre usados durante as relações sexuais, e ter menos parceiros sexuais também ajuda a reduzir o risco de infecção. Para prevenir o câncer colo, é necessário tomar regularmente as medidas preventivas recomendadas pelo médico. Recentemente, foram disponibilizadas vacinas para os tipos mais comum de HPV que infecta a área genital. Estima-se que as mulheres que recebem uma destas vacinas antes da infecção pelo HPV têm até 70% menos probabilidade de desenvolver cancro do colo do útero. Porém, ainda existem riscos e as mulheres vacinadas devem continuar a fazer exames médicos. Ao usar preservativo, o dispositivo cobre apenas a área do pênis, portanto você fica relativamente protegido, pois a área genital descoberta fica desprotegida e pode ocorrer contaminação pela mucosa da boca (Fiocruz, 2018).

A vacinação contra o HPV é o melhor método de prevenção primária, idealmente administrada a todos os homens e mulheres antes da atividade sexual, e 100% eficaz contra o HPV na vacina. Existem duas vacinas contra o HPV em nosso país. Uma vacina bivalente para HPV 16 e 18 (oncogênicos) e uma vacina quadrivalente para HPV 6 e 11 e também o 16 e 18. Uma vacina nonavalente cobrindo 9 tipos de HPV será desenvolvida futuramente, estendendo o estímulo a imunidade a outros tipos de HPV oncogênicos. As vacinas são consideradas seguras, os efeitos secundários são mínimos e não há provas científicas de muitos dos efeitos graves relatados para a sociedade (Ministério da Saúde, 2014).

### **3. METODOLOGIA**

A metodologia utilizada foi uma abordagem quantitativa descritiva (ex: tabelas de frequência e gráficos), baseada em resultados exatos e métodos estatísticos, juntamente com uma pesquisa exploratória, colocando o problema em evidência e explicativa, identificando os fatores que contribuem para tal problema. O tipo do estudo realizado foi um estudo de campo, feito em um laboratório da Grande Vitória – ES, onde foram fornecido todos os dados necessários dos pacientes retirados do SIL (Sistema de Informática Laboratorial) 'Shift', do período de janeiro a junho de 2023 para que pudesse ter sido feito um levantamento estatístico dos casos de HPV em diferentes tipos de amostras (citologia em meio líquido, swab vaginal e retal) retirados de análises posteriores mensais e como o método PCR pode ser eficaz nesse diagnóstico. O projeto proposto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário de Vitória.

### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os dados foram coletados através do banco de dados do laboratório de biologia molecular Diagnósticos do Espírito Santo (DES) LTDA no período de janeiro a junho de 2023, foram obtidos 280 resultados de HPV positivos, sendo 28,7% de alto risco oncogênico e 18,6% de baixo risco oncogênico. Dentre os resultados positivos obtidos pela infecção do HPV 123 pacientes apresentaram infecção com mais de um subtipo de HPV de alto risco, 74 pacientes apresentaram infecção com mais de um subtipo de baixo risco e 83 pacientes apresentaram infecção para alto e baixo risco. Também foram obtidos 312 resultados negativos (52,7%).

Para Carvalho e colaboradores (2020) é importante salientar que cerca de 85% das lesões de baixo grau contêm HPV do grupo oncogênico. A infecção por um tipo de vírus não previne a infecção por outros tipos de HPV e podem ocorrer múltiplas infecções. O tempo médio desde a infecção por HPV de alto risco até o desenvolvimento do câncer cervical é de aproximadamente 10 a 20 anos. Este período varia dependendo da espécie do vírus, da cepa, da capacidade de persistir e do estado imunológico do hospedeiro. Características pessoais predis põem à ocorrência de lesões, tais como: tabagismo, imunodeficiência (inclusive devido à infecção pelo HIV), desnutrição, câncer e uso de imunossuppressores.

Em nosso estudo como mostra na tabela 1, de perfil sociodemográfico, pode – se observar que a maioria dos pacientes é do sexo feminino, apresentando uma porcentagem de 98,8% em cima de apenas 1,2% de pacientes do sexo masculino. Já na questão dos municípios onde tais pacientes residem, apesar de termos encontrado

um número maior na região de Vitória com 36,7%, Vila Velha com 17,6% e Cariacica com 15,5%, houve uma variedade grande de municípios como: Serra, Viana, Guarapari, São Matheus, Aracruz, Linhares, Piúma, Domingos Martins e Marataízes.

Tabela 1: Perfil Sociodemográfico

<b>Sexo</b>	Número de pacientes	%
Feminino	585	98,8
Masculino	7	1,2
<b>Idade (anos)</b>		
18 a 26	144	24,3
27 a 35	183	30,9
36 a 44	146	24,7
45 a 53	79	13,3
54 a 62	30	5,1
63 a 71	10	1,7
<b>Município</b>		
Vitória	217	36,7
Vila Velha	104	17,6
Cariacica	92	15,5
Serra	67	11,3
São Matheus	44	7,4
Aracruz	21	3,5
Guarapari	17	2,9
Linhares	11	1,9
Conceição da Barra	7	1,2
Piúma	5	0,8
Viana	3	0,5
Domingos Martins	2	0,3
Marataízes	2	0,3

Fonte: Autoria Própria (2023).

Como pode - se observar na questão da faixa etária da tabela 1 de perfil sociodemográfico os pacientes de 27 a 35 anos apresentaram maior número de resultados positivos para infecção por HPV, ao contrário do que é sempre esperado ser maioria em jovens de 18 a 26 anos. Em segundo lugar ficaram os pacientes de 36 a 44 anos, quase encostado nos de 27 a 35, enquanto os de 18 a 26 ficaram em terceiro lugar, o que indica que ao contrário do que muitos pensam, não são só os jovens que tem que se preocupar com o vírus do HPV.

Dos resultados encontrados, a média de idade das mulheres com alterações citopatológicas sugestivo à infecção pelo HPV detectadas pelo PCR foi de 79,9%, variando entre 18 e 44 anos. Como dito por Machado e Pires (2017), um estudo realizado no estado do Pará mostrou quadro semelhante, com maior parte das mulheres na faixa etária entre 21 e 40 anos. Por outro lado, em Uruguaiana, no estado do Rio Grande do Sul, esta associação não se confirmou, visto que a infecção pelo HPV genital prevaleceu em mulheres mais jovens, com idade inferior a 25 anos. Acreditamos que as diferenças entre os estudos sejam decorrentes de características

das respectivas populações, com aspectos culturais próprios e diversos hábitos sexuais.

Em relação aos meios utilizados para os materiais pode – se observar de acordo com a tabela 2 que a citologia em meio líquido ainda é a mais utilizada com uma porcentagem de 74,3% em cima do swab vaginal com 22,1% e swab retal com 3,5%.

Em estudo, Silva e colaboradores (2018) analisaram que a citologia líquida proporciona melhor posicionamento celular, facilita a interpretação, reduz o número de glóbulos vermelhos, secreções fluidas inflamatórias e muco, e permite a preparação de amostras adicionais para reposição ou utilização conforme necessário de materiais com resíduos para testes moleculares e identificação de HPV e outros patógenos microbianos. Foi desenvolvida com o objetivo de minimizar as deficiências da citologia tradicional. Além disso, este método proporciona melhor casualização das células transferidas para as lâminas e permite o processamento de todos os materiais, evitando assim perdas indesejáveis de amostras celulares.

Tabela 2: Tipos de materiais para coleta de amostras de HPV

Material	Número de pacientes	%
Citologia em meio líquido	440	74,3
Swab vaginal	131	22,1
Swab retal	21	3,5
Total	592	100

Fonte: Autoria Própria (2023).

O método utilizado para realização desses exames foi o PCR em tempo real (RT-PCR), onde os dados obtidos apontam que os subtipos de HPV de alto risco 16, 18 e 35 aparecem em maior prevalência, como podemos observar na tabela 3, o que condiz com os estudos realizados pelos INCA (2023) e Nakagawa e colaboradores (2010) o qual apontam esses subtipos como principais causadores do câncer de colo de útero encontrados em 70% dos casos. 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. 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.

Tabela 3: Resultados dos exames de HPV por PCR

Resultados	Número de pacientes	%
Alto Risco 16	24	4,1
Alto Risco 18	21	3,5
Alto Risco 26	9	1,5
Alto Risco 31	11	1,9
Alto Risco 33	10	1,7
Alto Risco 35	18	3,0
Alto Risco 39	6	1,0

*continua*  
*continuação*

Alto Risco 51	3	0,5
Alto Risco 52	8	1,4
Alto Risco 53	12	2,0
Alto Risco 56	8	1,4
Alto Risco 57	3	0,5
Alto Risco 58	9	1,5
Alto Risco 59	7	1,2
Alto Risco 66	5	0,8
Alto Risco 68	10	1,7
Alto Risco 69	3	0,5
Alto Risco 82	3	0,5
Baixo Risco 6	22	3,7
Baixo Risco 11	19	3,2
Baixo Risco 40	9	1,5
Baixo Risco 42	7	1,2
Baixo Risco 43	15	2,5
Baixo Risco 54	13	2,2
Baixo Risco 61	14	2,4
Baixo Risco 70	11	1,9
Negativo	312	52,7
Total	592	100

Fonte: Autoria Própria (2023).

Para Leto e colaboradores (2011) e Noronha e colaboradores (2000) a manifestação mais comum do HPV na genitália são as verrugas anogenitais ou condilomas acuminados. Essas lesões aparecem como pápulas, nódulos ou placas moles, filiformes, rosadas, sésseis ou pediculadas, além disso eles podem apresentar crescimentos exofíticos semelhantes aos da couve-flor e são frequentemente assintomáticos. Os principais tipos de HPV detectados nessas lesões são os tipos de HPV de baixo risco 6 e 11, inclusive isso se conclui na tabela 4, mostrando a prevalência maior desses dois subtipos em relação aos outros. HPVs de alto risco, como os HPVs 16 e 18 e outros tipos de HPV, podem ser encontrados isolados ou, mais comumente, coinfectando com os HPVs 6 e 11.

De acordo com Rosa e colaboradores (2008) e Carvalho (2020) um grande número de lesões da região cervical está associado à presença do HPV, desde anormalidades citológicas incipientes, displasias de diferentes graus, até o câncer cervical. Observa-se relação causal de HPV e câncer de colo do útero em cerca de 90% a 100% dos casos. A infecção cervical por alguns tipos de HPV é um fator precursor na gênese da neoplasia cervical, embora outros cofatores atuem para que ocorra o desenvolvimento da neoplasia. Os HPVs 16 e 18 são os dois tipos carcinogênicos mais importantes e responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas cervicais e 50% das neoplasias intraepiteliais de grau III. Os HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 e 58 também têm sido detectados nas lesões de câncer cervical.

Tabela 4: Pacientes com mais de um subtipo de HPV

Resultado	Número de pacientes	%
AR com mais de 1 subtipo de HPV	123	24,3
BR com mais de 1 subtipo HPV	74	14,6
Pacientes com alto e baixo risco de HPV	83	16,4
Negativos para HPV	312	61,7
Total:	592	100

Fonte: Autoria Própria (2023)

Como mostrado na tabela 4, 123 pacientes obtiveram resultado positivo para HPV de alto risco com mais de um subtipo, encontrando um percentual de 24,3%. Já para o HPV de baixo risco com mais de um subtipo, houve um número menor comparado ao alto risco, sendo de 74 pacientes com esse resultado, encontrando um percentual de 14,6%. Também obtivemos pacientes detectados com infecção de alto e baixo risco no mesmo resultado, sendo 83 o número encontrado, gerando 16,4% de percentual.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) está entre as patologias mais comuns, com alta prevalência de casos todos os dias, sendo um problema de saúde com várias ocorrências em âmbito hospitalar e comunitário. Com isso em mente, vemos a importância do uso da técnica PCR (reação em cadeia da polimerase) da biologia molecular para obter resultados mais precisos, sendo capaz de detectar os subtipos de alto e baixo risco do vírus, sendo de alto risco os oncogênicos, reduzindo assim o tempo de tratamento e melhorando o prognóstico.

O desenvolvimento da PCR é considerado um grande avanço no campo da biologia molecular, pois este método permite interrogar o que se sabe sobre o genoma e a sua expressão. Esta técnica consiste numa reação de amplificação *in vitro* de uma região específica de um ácido nucleico e é considerada simples de implementar, embora exija vários reagentes e flutuações de temperatura do aparelho termociclador em três etapas (desnaturação, recozimento e extensão). Os resultados podem ser determinados por eletroforese ou em tempo real (PCR em tempo real). Com a técnica de PCR consegue-se pegar casos precoces, que talvez pela citologia do Papanicolau não pegaria, ou seja conseguiria pegar no momento inicial, que na triagem do paciente não passaria casos precoces com outra técnica citológica, então isso para a terapia, o tratamento do paciente para com o médico é muito necessário.

Através dos dados obtidos, foi analisado que pacientes com resultados positivos para HPV podem ter subtipos de alto e baixo risco, sendo quase sempre mais de um encontrado em cada um deles, e a maioria encontrada é de alto risco (oncogênicos), sendo os subtipos 16 e 18 com maior prevalência, já dentre os subtipos de HPV de baixo risco, que são responsáveis pela maioria das verrugas genitais e condilomas acuminados, foram encontrados em maioria os tipos 6 e 11 que em especial aparecem em 90% das vezes.

Conclui – se então que este estudo foi extremamente importante porque comprovou como a técnica PCR consegue ser tão sensível e eficaz a ponto de fazer a detecção dos subtipos do vírus do HPV, tanto de alto como de baixo risco, sendo possível que uma melhor assistência, tanto em casos de infecção comunitária quanto hospitalar, garantindo uma conduta terapêutica mais precisa e a resolução de grande parte dos casos.

## REFERÊNCIAS

CARVALHO, Isis. **Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo papilomavírus humano (HPV)**. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ress/a/xLM3FTG5mnTM8kHT7b8HLpn/?format=pdf>. Acesso em: 01/11/2023.

CASTRO, Therezita M et al. **Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital**. 2008. Acesso em: 25/03/2023. Disponível em <https://www.scielo.br/j/rboto/a/S9z7MKr7Rz5mn6TQnC7nFNM/?lang=pt#:~:text=A%20t%C3%A9cnica%20PCR%20foi%20o,e%20amostras%20de%20tecido14>.

DUBIELA, Carla. **Detecção por RT-PCR em tempo real (Taqman) e caracterização molecular parcial de vírus que infectam a videira**. Paraná, 2012. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/bitstream/1/1376/1/000213833.pdf>. Acesso em: 10/10/2023.

FEBRASGO. **Doenças do trato genital inferior**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/sms-12915>. Acesso em 20/06/2023.

FERREIRA, Antônio; MORAES, Sandra. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro, 2021. Acesso em: 05/06/2023.

FIOCRUZ. **Prevenção e tratamento do HPV**. 2018. Acesso em: 21/03/2023. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/prevencao-e-tratamento-do-hpv>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2018**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Acesso em: 24/03/2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>.

KENNE, Edilaine et al. **Diagnóstico molecular de HPV em amostras cérvicovaginais de mulheres que realizam o papanicolaou**. Rio Grande do Sul, 2014. **Revista Cinergis**, v 15, n 4, p 201-206. Outubro/dezembro. 2014. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/cinergis/article/view/5517>. Acesso em: 20/10/2023.

LETO, Maria das Graças et al. **Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas**. São Paulo, 2011.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/abd/a/W8xQS6MSSk7tT8CLRCnbs8f/?format=pdf>. Acesso em: 03/11/2023.

MARTINS, Nelson et al. **Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento**. 2014. Acesso em: 18/06/2023.

MENÊSES, Marta; TORALLES, Maria BETÂNIA; MENDES, Carlos. **Evolução da técnica de PCR: sua contribuição no diagnóstico da infecção por HPV**. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v. 18, n. 3, p. 361-366, set./dez. 2019. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/02/1359168/34480-texto-do-artigo-127070-1-10-20200207-1.pdf> Acesso em: 22/03/2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático sobre HPV**. Brasília, 2014. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/guia-pratico-hpv-2013.pdf>. Acesso em: 21/03/2023.

NAKAGAWA, Janete; SCHIRMER, Janine; BARBIERI, Márcia. **Vírus HPV e câncer de colo de útero**. São Paulo, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reben/a/b7Xh54fHGTFGWtwqkXxcBmy/>. Acesso em: 30/10/2023.

NOGUEIRA, Isabelly; REIS, Euler. **A utilização das técnicas moleculares no diagnóstico do papiloma vírus humano (HPV)**. Belo Horizonte, 2022. Disponível em: <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/26889/1/A%20UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DAS%20T%C3%89CNICAS%20MOLECULARES%20NO%20DIAGN%C3%93STICO%20DO%20PAPILOMA%20>. Acesso em: 22/03/2023

NORONHA, Vânia et al. **Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina**. Uberaba – MG, 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/7WpwwgK964pGpDdHHdnG6w3j/>. Acesso em: 05/12/2023.  
NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. **PCR em tempo real**. *Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento*, v. 33, p. 10–13, 2004.

ROCHA, Bruno. **Desenvolvimento de metodologias para identificação molecular do HPV**. São Carlos, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/8289/TeseBGR.pdf?sequence=>. Acesso em: 16/06/2023.

RODRIGUES, Adriana et al. **Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas**. *Bras Patol Med Lab*, v. 45 • n. 6 • p. 457-462 • dezembro 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/bYb4qQQNZBgZVjyQQBqwzGC/?format=pdf&lang=pt> . Acesso em 01/10/2023.

ROSA, Maria et al. **Papilomavírus humano e neoplasia cervical**. Criciúma, SC, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/XVHZYXNwmNPtY9CVhPrqvXn/>. Acesso em: 06/12/2023.

SILVA, Elisvania et al. **Diagnóstico molecular do papilomavírus humano por captura híbrida e reação em cadeia da polimerase**. Revista FEMINA, vol 43, nº 4, julho/agosto, 2015. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2015/v43n4/a5311.pdf>. Acesso em: 25/03/2023.

SILVA, Ruan et al. **Desempenho da citologia em meio líquido na identificação de agentes microbiológicos cérvico-vaginais**. Caruaru – PE, 2018. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/artigos/desempenho-da-citologia-em-meio-liquido-na-identificacao-de-agentes-microbiologicos-cervico-vaginais/>. Acesso em: 03/11/2023.