

ANÁLISE COMPARATIVA DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA GENOTIPAGEM DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO – HPV

Jéssica Gabriela Fernandes Assunção • Graduanda do curso de Enfermagem. Escola da Saúde
– Universidade Potiguar. E-mail: jgabiassuncao@hotmail.com

Amanda Kelly de Araujo Correia • Graduanda do curso de Ciências Biológicas. Escola da Saúde
– Universidade Potiguar. E-mail: amandacorreia2@hotmail.com

Envio em: Julho de 2012

Aceite em: Março de 2014

RESUMO: São diagnosticados, anualmente, cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical em todo o mundo e 99% desses casos são correlacionados ao Papiloma Vírus Humano (HPV). O objetivo desta revisão é apresentar as diversas técnicas de identificação e genotipagem viral do HPV e diferenciá-las com o intuito de apontar pontos positivos e negativos de cada uma, permitindo a escolha, pelo pesquisador, da técnica mais apropriada ao estudo realizado. Métodos: foram avaliadas a partir de publicações disponíveis nos bancos de dados da Scielo Brasil, Science Direct, e Pubmed. Entre as técnicas de genotipagem viral para o HPV, são abordadas nesta pesquisa: Exame Citopatológico (papanicolau); Reação de Polimerização em cadeia – PCR e suas variações: PCR em tempo real (qRT – PCR); PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism); Nested – PCR e Microarranjos. Resultados e conclusões: Entre as técnicas citadas neste artigo, todas possuem uma alta relevância na detecção de genotipagem do HPV, ficando a critério do pesquisador a escolha de qual utilizar. A técnica de Nested – PCR demonstra ser a mais vantajosa na detecção do vírus, pelo fato de ter uma maior sensibilidade, em comparação com as demais técnicas abordadas.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano. Câncer Cervical. Genotipagem Viral. PCR. Técnicas de Genotipagem.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR GENOTYPING OF DE HUMAN PAPILOMA VIRUS – HPV.

ABSTRACT: Are diagnosed each year about 500,000 new cases of cervical cancer worldwide, where 99% of these cases are related to human papilloma virus (HPV). The objective of this review is to present the various techniques for the identification and genotyping of HPV viral and differentiate them with the intention of showing the positive and negative points of each, allowing the researcher to choose the most appropriate technique to study. Methods: We evaluated, from publications available in data bases Scielo Brazil, Science Direct, and Pubmed, several viral genotyping techniques for HPV, including: Cytopathology (Pap) Polymerase chain reaction–PCR and its variations: real-time PCR(qRT – PCR), PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism),Nested–PCR and Microarrays. Results and Conclusions: Among the techniques mentioned in this article, all have a high relevance for the detection of HPV genotyping, getting up to the researcher the choice of which to use. It was observed that the technique of nested-PCR, between the raised, it is demonstrated to be the most advantageous in the detection of the virus, by having a higher sensitivity compared with the other techniques discussed.

Keywords: Human Papilloma Virus. Cervical Cancer. Viral Genotyping. PCR, Genotyping Techniques.

1. INTRODUÇÃO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) está frequentemente associado à lesão intra-epitelial e ao câncer invasivo do colo uterino. Anualmente, são diagnosticados cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical no mundo¹. São conhecidos mais de 100 tipos de HPV, dos quais, 40 estão relacionados à região ânus-genital, entretanto, apenas 15, que são 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, foram considerados oncogênicos, devido à relação com o câncer. O HPV é caracterizado de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética, que consiste em determinar relações ancestrais de espécies conhecidas².

O HPV pertencente à família *Papillomaviridae* e seu material genético é um DNA dupla fita de forma circular, possuindo cerca de 8.000 pares de bases (pb). Estruturalmente, o HPV está arranjado em: genes precoces (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), caracterizados pela formação de proteínas não estruturais; genes tardios (L1 e L2), caracterizados pela formação de proteínas estruturais do capsídio, sendo estes considerados os genes mais conservados do HPV; e a região reguladora LCR, que está relacionada com os fatores de transcrição viral. É sabido que as lesões malignas e os tumores do colo do útero estão correlacionados à perda de função de supressores de tumores p21 e proteínas da família do retinoblastoma, como pRb, p107 e p130, responsáveis pela regulação negativa na fase G1 para S. A integração do material viral ao genoma da célula hospedeira leva à perda da função dos genes virais E1 e E2, entretanto, a expressão dos genes E6 e E7 não é perdida e os produtos levam ao dano do mecanismo de regulação do ciclo celular, como descrito acima; além disso, os produtos dos genes E6 e E7 estão associados à perda da função apoptótica, levando a célula a estar sempre em reprodução.

As principais formas de transmissão do HPV se dão através de relação sexual desprotegida, fômites e transmissão parenteral. A infecção e a prevalência do vírus estão associadas a alguns fatores de risco, como: genótipo viral, carga viral, persistência e integração do DNA viral com o genoma da célula hospedeira, início precoce de relações sexuais, multiparidade, múltiplos parceiros sexuais, o uso de contraceptivos orais, tabagismo, infecção por doenças sexualmente transmissíveis.³

Pelo fato do HPV ser associado a, aproximadamente, 99% dos casos de câncer uterino, a identificação e genotipagem viral são bastante relevantes. Como previamente dito, alguns tipos do HPV são considerados oncogênicos, todavia, a análise e a classificação do vírus permitem a discriminação das terapias antivirais e das drogas utilizadas, possibilitando, assim, os avanços científicos em relação à patologia e na busca pela sua cura.

Com os avanços da biotecnologia, a biologia molecular se torna uma grande aliada na identificação eficiente e rápida do HPV. A obtenção de um diagnóstico precoce possibilita um acompanhamento maior do tratamento, permitindo, como descrito acima, uma análise sobre o tratamento que vem sendo realizado.

O objetivo desta revisão é apresentar as diversas técnicas de identificação e genotipagem viral do HPV e diferenciá-las com o intuito de apontar os pontos positivos e negativos de cada uma, permitindo a escolha, pelo pesquisador, da técnica que melhor se enquadra ao estudo que o mesmo está realizando.

2. MÉTODOS

Este estudo constitui-se de uma revisão da literatura entre o período de julho de 2011 a novembro do mesmo ano, para a realização de uma pesquisa a respeito das técnicas de genotipagem do HPV. As pesquisas foram feitas em artigos científicos disponibilizados no banco de dados da Scielo Brasil, Science Direct, e Pubmed, além da internet livre, publicados no período de Julho de 1996 e Maio de 2011. As palavras chaves utilizadas foram: viral; genotyping viral; genotipagem HPV; human papillomavirus; PCR (polymerase chain reaction). A partir de uma análise de 55 publicações, foram selecionados 37 artigos, que serviram de base para a revisão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papiloma vírus constitui uma cepa de vírus que atinge mais de 500.000 pessoas anualmente, em diversas partes do mundo, sendo considerada a maior doença sexualmente transmissível. A identificação dos mais de 100 tipos do HPV possibilita o acompanhamento e tratamento mais eficaz do paciente, vindo a diminuir, assim, as taxas de mortalidade e morbidade. O primeiro passo para um tratamento correto é a identificação do HPV e dos seus genótipos; para isso, a biologia molecular e os avanços biotecnológicos oferecem diversas metodologias que serão listadas nesta revisão.

3.1. EXAME CITOPATOLÓGICO (PAPANICOLAU)

O exame citopatológico (exame do Papanicolau) não é uma técnica de biologia molecular, mas será abordado devido a ser, comumente, usado no diagnóstico do HPV, mostrando-se relevante sua presença neste artigo. O Papanicolau é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), sendo um dos principais exames contemplados na saúde da mulher, indicando-se que tal método venha a ser realizado pelo menos uma vez ao ano. Essa técnica consiste na coleta do material genético, a partir de raspagem cervical realizada pela inserção do espéculo vaginal, instrumento ginecológico que possibilita a visualização do colo do útero; em seguida, é utilizado um swab estéril, que coleta a amostra cervical para o esfregaço na lâmina, que será pigmentada por um conjunto de três corantes: Hematoxilina, OG-36 e EA-36 ou EA-65⁴. Após a coloração, as lâminas são observadas e caracterizadas, a partir da morfologia celular, e classificadas, como apresenta a tabela 1.

Tabela 1 – Classificação segundo a morfologia celular de micrografias obtidas de esfregaço cervical após coloração com corantes derivados da hematoxilina.

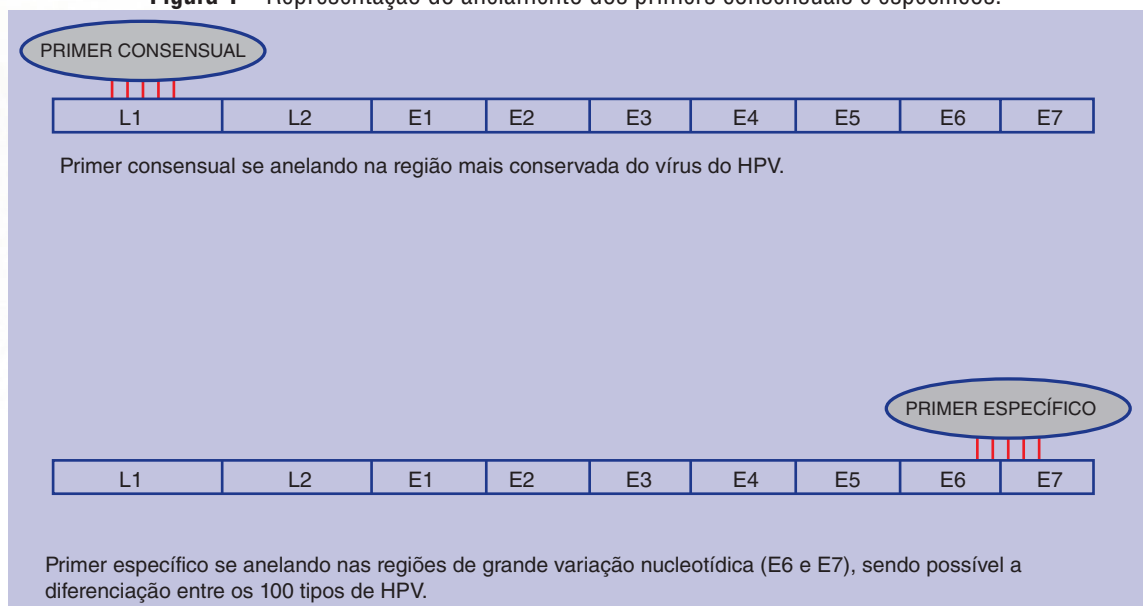
CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS
Normal	Amostra sem alterações celulares.
LSIL/ NIC I/ Displasia leve	O epitélio escamoso atipias nucleares (hipercromasia, alterações de forma do núcleo, irregularidades com espessamento localizado na membrana nuclear, mitoses frequentes) associadas a um borramento bem evidente do padrão de estratificação de várias camadas do epitélio.

HSIL/ NIC II / Displasia Moderada	As atipias nucleares presentes no epitélio são mais intensas e nítidas do que as da displasia leve, acometendo, perceptivelmente, 2/3 da espessura do epitélio, sendo mais visível o desarranjo da camada de estratificação.
HSIL/ NIC III / Displasia Severa – carcinoma “in situ”	Neste estágio, as células se apresentam em “sincícios”, que significa desprendimento do epitélio, isso ocorre devido à célula ter pouca diferenciação. Morfologicamente, a célula se encontra com um aspecto de profundas, praticamente basais, com atipias nucleares muito intensas.
Carcinoma Invasivo	No quadro de carcinoma invasivo, o tecido se encontra em profunda desorganização, apresentando grandes nucléolos; muitas vezes, possui um aspecto em fibra, alongado, sendo esta uma das principais características da invasão, sendo abundante o processo mitótico.

a. Reação de Polimerização em Cadeia – PCR

A reação de polimerização em cadeia (PCR) consiste na técnica de biologia molecular mais empregada na identificação e genotipagem viral; tal método tem como objetivo a amplificação de sequências específicas do material genético disponível. Existem, basicamente, duas classificações para PCR: genérica ou específica. Na PCR genérica, os primers (sequência de nucleotídeos específicos, desenvolvidos de acordo com o trecho que deseja amplificar, tendo o papel de sinalizador de início e término do fragmento) são complementares à região mais conservada do vírus e são chamados de consensuais; no vírus do HPV, a região alvo é a L1. A PCR específica tem como objetivo a genotipagem do vírus em análise; os primers usados são complementares a regiões com variação de nucleotídeos que determina o genótipo do vírus; esses primers são chamados de específicos e, no HPV, os alvos são os genes E6 e E7. Sendo assim, podemos concluir que o uso de primers consensuais é indicado, quando o objetivo é identificar a presença do vírus no material de amostra, já o específico, além de identificar, indica qual dos 100 tipos de vírus está presente na amostra⁶. A figura abaixo representa o anelamento dos primers consensuais e específicos.

Figura 1 – Representação do anelamento dos primers consensuais e específicos.



Pode-se dividir em três etapas, necessitando serem antecedidas por um pré-aquecimento a 94°C durante 4 minutos. Logo após, segue a primeira etapa, que é a desnaturação, processo em que a dupla fita se separa a partir do aquecimento a 94°C por 30 segundos; a segunda etapa se chama anelamento, na qual, os primers (sequência de nucleotídeos específicos desenvolvidos de acordo com o trecho que deseja amplificar, tendo o papel de sinalizador de início e término do fragmento) associam-se ao DNA fita simples a uma temperatura de 45°C por 1 minuto; por último, é a etapa de extensão, na qual, a enzima DNA polimerase reconhece o primer na ponta 5'-3', sintetizando a nova fita em uma temperatura de 72°C por 1 minuto e meio; esse ciclo se repete 40 vezes, finalizando com uma extensão a 4°C durante 10 minutos².

A PCR é acompanhada de uma técnica chamada: eletroforese, a qual possibilita a visualização da banda (fragmento). A mesma se utiliza dos princípios físico-químicos para separar os fragmentos, que podem ser: RNA, DNA ou proteínas. O gel de agarose (geralmente a 2%) é colocado em solução tampão, por onde irá passar uma corrente elétrica. No caso do HPV, por ser DNA, tendo, assim, carga negativa, a amostra migrará do polo negativo para o positivo. Logo após, o gel é corado em solução de SYBER® GREEN ou brometo de etídio. O fragmento que tiver menor peso molecular se depositará na porção mais inferior do gel. A visualização das bandas ocorre por meio de luz UV. Como visto, o positivo para HPV em PCR se é dado quando ocorre a presença da banda no gel de agarose.

b. PCR em tempo real (qRT – PCR)

Transcriptase Reversa (RT– PCR)

A RT-PCR tem como objetivo a conversão da fita simples de mRNA em DNA complementar (cDNA), tal mudança ocorre com a utilização da enzima transcriptase reversa. É a partir das moléculas de cDNA que a reação da PCR é realizada. A utilização da RT-PCR é fundamental, quando o pesquisador detém um organismo cujo genoma é de característica fita simples, ou seja, RNA. A partir da conversão da característica do material genético em DNA, as demais técnicas de biologia molecular poderão ser submetidas. Abordaremos, a seguir, a PCR em tempo real, cuja realização só ocorre através de uma etapa precedente RT-PCR.

A realização da PCR em Tempo Real requer uma etapa de mudança de material genético, como descrito acima. A qRT-PCR possui as mesmas três etapas da PCR convencional, diferenciando-se, como o próprio nome diz, pela quantificação de expressão viral em tempo real; essa visualização ocorre na forma de gráfico durante a execução da técnica. 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 notificada pode ser obtida por vários métodos, sendo o mais utilizado o corante intercalador de bases SYBR® Green e brometo de etídio, entretanto, técnicas mais avançadas, como a de Beacons, que são oligonucleotídeos que possuem um fluoróforo na ponta 5' e na extremidade 3' um não-fluoróforo (quencher – apagador), vem sendo abordadas. O princípio da técnica de Beacon é o fato de, na fase inicial da PCR, as pontas 5'-3' estarem próximas uma da outra; tal proximidade permite a transferência de energia do corante repórter para o apagador, impedido, assim, qualquer emissão de radiação, entretanto, quando o processo avança para a etapa de anelamento, ou seja, quando a temperatura resfria, ocorre a hibridização dos sinalizadores, que, nesse momento, encontra-se em forma linear. Nessa nova estrutura, a ponta do corante repórter emite a radiação detectada, a emissão da fluorescência é proporcional

ao material amplificado. A presença do sinalizador não impede a extensão da enzima DNA polimerase, pois é removido com o prolongamento da fita alvo⁷.

Utiliza-se de alguns equipamentos para a medição da radiação emitida pelo sinalizador, são eles: Sistema óptico, termociclador, hardware e um software. A qRT-PCR possui 3 fases particulares, além da fase convencional: fase exponencial, na qual, o dobro do produto é acumulado em cada ciclo; fase linear, na qual, os reagentes são utilizados com um alta variabilidade; e a fase platô, em que acontece o término da reação, ou seja, os produtos não são mais produzidos e começam a ser degradados, é nessa etapa que, na PCR tradicional, é realizada a aplicação do produto da PCR no gel.

c. PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*)

A utilização da PCR-RFLP junto à convencional possibilita a detecção de cerca de 40 tipos de HPV, tal técnica faz uso de enzimas de restrição para genotipagem viral.

O procedimento consiste na amplificação do DNA por uma PCR convencional, seguida do processo da ação enzimática, que são capazes de reconhecer sítios de restrição específicos e clivados; indivíduos distintos possuem alterações ao longo de seu material genético, o que gera polimorfismo. Ao clivar as moléculas, as endonucleases formam fragmentos com diferentes pesos moleculares, sendo assim, com o auxílio de sondas hibridizadoras, a detecção das variações gênicas do organismo em estudo pode ser realizada.

O produto da PCR é disposto em tubos, à qual são acrescentadas as endonucleases: Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau 3AI (Life Technologies GIBCO/BRL); ocorre a clivagem (de acordo com as condições do fabricante), logo após, a solução é submetida a banho-maria, em, aproximadamente, 37°C por duas horas; no término, é acrescentado 4µl de *loading buffer* (0,25% de azul de bromofenol, e 15% de Ficoll tipo 400); uma alíquota de 24µl foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, e submetida à coloração; a observação das bandas formadas ocorre por estímulos de luz UV; nesse estágio, 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)⁸.

d. Microarranjos

O sistema de micro arranjo, também conhecido como biochip, é frequentemente utilizado na análise de expressão gênica e análise de genoma funcional. Em uma lâmina de vidro, está disposta, de forma organizada e fixa, sequências de sondas, que possuem a capacidade de se hibridizar com a amostra, sendo esse fato oriundo do princípio da complementaridade ou pela semelhança na sequência⁹.

Na detecção do HPV, o biochip tem a capacidade de determinar a presença de 24 tipos de HPV; destes, 9 são considerados de baixo risco oncogênico e 15 de alto risco, como mostra a tabela 2. A amostra cervical é, inicialmente, submetida a uma PCR convencional, em que a região L1 é amplificada pelo par de primer GP+. Para a reação de controle, usa-se a β-globina, que, também, sofre a amplificação. Os produtos da PCR serão submetidos à eletroforese a gel de agarose; posteriormente, 10µl da amostra irão ser desnaturadas à temperatura de 95°C por cinco minutos, sendo, após, adicionada a solução de hibridização e disposta na lâmina. O processo ocorre por 90 minutos a uma temperatura de 43°C, seguida

de lavagem e secagem. Os dados obtidos serão analisados pelo sistema de scanner Chip DNA; cada hibridização DNA-Sonda corresponde à positividade para aquele determinado tipo de HPV. É importante salientar que as amostras que forem positivas no gel de agarose e negativas no microarranjo são consideradas HPV-outras, ou seja, não constituem os 24 tipos de HPV de potência de análise do microarranjo¹⁰.

Tabela 2 – Tipos de HPV conforme o grau de risco.

Grau de Oncogenia	Tipos de HPV
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66.
Baixo Risco	6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 70.

e. Nested – PCR

A nested – PCR é uma técnica bastante sensível; tem como metodologia a amplificação de uma sequência presente em um fragmento previamente amplificado, diferentemente da PCR convencional, nessa o pesquisador deverá utilizar dois sistemas de primers diferentes. A técnica da Nested – PCR constitui-se de dois “rounds” de PCR. No primeiro, usa-se o par de primers MY09/MY11, que se anela na região L1, produzindo um fragmento de 450pb; essa região é 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 a primeira etapa, uma alíquota de 2µl do produto obtido é submetida a uma nova PCR, entretanto, esta se utiliza do par de primers GP5+/GP6+ que gera 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%¹¹.

Como observado no decorrer do artigo, vários métodos moleculares são passíveis de detectar o vírus do HPV. Cada técnica possui um lado positivo e negativo, ficando a cargo do pesquisador a busca da metodologia que melhor responda a suas necessidades. A tabela abaixo apresenta as principais vantagens e desvantagens das técnicas aqui abordadas.

Tabela 3 – Comparação entre as técnicas de genotipagem do HPV.

Técnicas de análise	Pontos Negativos	Pontos Positivos
Papanicolau	A técnica de Papanicolau oferece uma margem de erro que varia entre 2 a 50% nos exames falso-negativos; tal índice deve-se a fatores, como: erro na coleta, de escrutínio e de interpretação do diagnóstico ¹¹ .	Possibilita a identificação de anormalidade histológica da mucosa infectada pelo HPV em estágios tratáveis, além de ter um custo barato e disponível ao SUS. ¹¹
PCR convencional	Pode ocorrer falha de amplificação por ineficiência de primers ou decorrente de um erro de extração de DNA ¹² .	Potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos; identificação de um grande número de tipos de HPV. ¹²

PCR em Tempo Real	Alto custo do equipamento de análise da amostra (softwares).	Menor índice de contaminação da amostra; técnica de execução rápida (30 minutos), sendo considerada uma técnica sensível e eficiente. ¹²
PCR – RFLP	A técnica apresenta menor sensibilidade, quando a amostra está infectada por múltiplos tipos de HPV; não identifica todos os tipos de HPV de alto risco; Necessidade, em muitas ocasiões, do uso de várias enzimas de restrição. ⁸	Deteção de um grande número de tipos de HPV e financeiramente vantajosa, facilitando o seu manejo pelos laboratórios de deteção. ⁸
Microarranjos	Técnica ainda pouco acessível.	Detecta múltiplas infecções em uma amostra ⁹ .
Nested – PCR	Necessidade de ocorrer duas etapas de PCR; técnica demorada.	Alta sensibilidade na deteção; mostra-se que essa técnica é 38% mais específica do que a PCR convencional, Identifica o DNA – viral em amostras com infecção múltiplas. ²

Com o avanço das Ciências Biotecnológicas, atualmente, há varias técnicas de identificação do vírus do HPV. Das técnicas abordadas nesta revisão, a metodologia Nested – PCR apresentou-se mais eficiente do que as demais. A alta capacidade de identificação da técnica se dá, pois a amostra é submetida a dois “rounds” de PCR. Sendo assim, o uso dessa técnica seria de fundamental relevância para a deteção de pacientes que se encontram entre os fatores de risco, como os já citados acima.

4. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Genética (LBMG) da Universidade Potiguar – UnP, pelo apoio e incentivo. E, por fim, a Deus, por ter nos concedido força para darmos continuidade ao trabalho.

5. REFERÊNCIAS

1. Albrecht V, Chevallier A, Magbone V, Barbry P, Vandebos F, Bongain A, et al. Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *Journal of Virological Methods* 2006 Nov;137(2):236-44. Epub 2006 Aug 1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879879>
2. Carvalho NO, Castillo DM, Perone C, Januário JN, Melo VH, Filhos GBI. Comparison of HPV genotyping by type-specific pcr and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2010 fev; 105 (1):73-78. [Acessado em 12 jul 2011]. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?oc10011>
3. Brandão VCRAB, Lacerda HR, Silvas NL, Ximenes RAA. Frequency and types of human papillomavirus among pregnant and non-pregnant women with human immunodeficiency

virus infection in Recife determined by genotyping. Mem Inst Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, 2009 ago; 104(5):755-763. [Acessado em 15 jun. 2011].Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000500016

4. Hasenack BS, Miquelão AKM, Marquez; Pinheiro EHT, Urnau AP.Estudo comparativo dos diagnósticos de vaginose bacteriana pelas técnicas de Papanicolaou e Gram. Revista Brasileira de Análise Clínica-RBAC. 2008.

5. Araújo SR, Citologia e Histopatológica Básica do Colo do Uterino para Ginecologista. Curitiba: VP editora; 1999 [Acessado em 21 jul 2011]. Disponível em: <http://www.youblisher.com/p/104870-atlas-de-citologia-pdf/>

6. Magalhães IM, Moysés N, Afonso LA, Oliveira LHS, Cavalcanti SMB. Comparação de dois pares de oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase para detecção de Papilomavírus humanos em esfregaços cervicais. DST – J bras Doenças Sex Transm. 2008; 20(2): 93-98. [Acessado em 25 jul 2011].Disponível em: <http://www.dst.uff.br//revista20-2-2008/4.pdf>

7. Broccolo F, Cocuzza CE. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by a real-time PCR-based system. Elsevier; 2007.

8. 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.

9. 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. [Acessado em 03 ago 2011].Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462007000400014

10. 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. [Acessado em 10 ago 2011]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090825805003434>

11. Siriaunkgul S, Suwiwat S, Settakon J, Khunamornpong S, Tungsinmunkong K, Boonthum A, et al. HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. Elsevier-Gynecologic oncology. 2008.

12. 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. [Acessado em 15 ago 2011]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao6.pdf

13. Rodrigues AD, Cantarelli VV, Frantz MA, Pilger DA, Pereira FS. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2009

14. Nobre RJ, Almeida LP, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. Revista Brasileira de Análise Clínica-RBAC. 2008.