

Artigo original

A pesquisa do papilomavírus humano (HPV) pela reação de hibridização *in situ* realizada no Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz

Human papillomavirus (HPV) analysis by the in situ hybridization reaction performed at the Laboratory of Quantitative Pathology of the Center of Pathology of Adolfo Lutz Institute

¹Leonardo José Tadeu de Araújo, ¹Karolina Rosa Fernandes Beraldo, ¹Daniela Soares Damaceno, ¹Suely Nonogaki, ¹Neuza Kasumi Shirata, ¹Lidia Midori Kimura, ¹Marina Oyafuso, ¹Celso di Loreto, ¹Juliana Mariotti Guerra

¹Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz; ¹Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

O HPV (papilomavírus humano) é um grupo de vírus de estrutura não-envelopada, que possui em sua dupla fita de DNA cerca de 8000 pares de base¹ e apresentam tropismo por células epiteliais de revestimento epidérmico e mucoso.² São subdivididos em dois grupos, conforme sua capacidade em lesionar o tecido: baixo risco (subtipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81) e alto risco (subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59).³

A infecção pelo HPV pode causar desde uma lesão assintomática e autolimitante até o desenvolvimento de lesões neoplásicas em pele e mucosas, principalmente no colo do útero, apresentando altos índices de mortalidade.^{2,4} A principal via de transmissão é a sexual, sendo elevada a prevalência do vírus em mulheres sexualmente ativas. Estudos mostram que até o ano de 2014, pelo menos 50% da população foi infectada pelo HPV e 25% das mulheres com exames citológicos normais possuíam o vírus.⁵ O câncer do colo do útero ou câncer cervical é a quarta neoplasia mais comum entre as mulheres, com estimativa de 528.000

novos casos, principalmente em países subdesenvolvidos, é considerada a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo, causando 266.000 mortes só em 2012.⁶ O diagnóstico morfológico para lesões no colo do útero é utilizado tanto em esfregaços celulares (citologia), quanto em cortes de tecido (histopatologia). A histopatologia é capaz de graduar as lesões de acordo com o seu potencial proliferativo⁷ e a classificação histopatológica, utilizada pela OMS-IARC, inclui as lesões intra-epiteliais em três graus: NIC 1, NIC 2 e NIC 3. A lesão NIC 1 apresenta maturação em dois terços do epitélio e as células possuem atípias variáveis que podem ter efeito citopático decorrente da infecção por HPV, a coilocitose. Anormalidades nucleares também estão presentes nestas lesões. Já em lesões NIC 2, a maturação está presente em metade do epitélio e a atipia nuclear se torna bem evidente. Em lesões de NIC 3, a maturação pode estar ausente ou confinada ao terço superior do epitélio e as anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda a espessura do epitélio. Neste grau, as mitoses atípicas são frequentes.⁸

As lesões causadas pelo HPV, no homem, podem afetar o trato geniturinário desde a genitália externa, a região perianal e o trato urinário superior, sendo mais frequente na região peniana. A maturação e a diferenciação epitelial nas lesões provocadas pelo HPV são irregulares e as alterações nucleares podem variar de leves a severas, sendo denominadas lesões intraepiteliais escamosas.⁹ O carcinoma do pênis é a neoplasia do sistema geniturinário mais frequente na América do Sul e África, possuindo incidência de 4/100.000, superior à Europa, onde ocorre um caso em 100.000.¹⁰ Muitos trabalhos apontam que a causa do carcinoma peniano é multifatorial e incluem tabagismo, higiene precária, fimose, inflamação e infecção por outras doenças sexualmente transmissíveis.

Em paralelo, tem sido constatado o aumento de outras lesões anogenitais por papilomavírus humano.¹¹ O condiloma acuminado anogenital foi a doença sexualmente transmissível mais diagnosticada no Brasil durante o período de 1998 a 2001, tanto em homens (39,6%) como em mulheres (21%), sua incidência vem aumentando nos últimos anos, associada à aids.¹² As alterações histológicas básicas desse tipo de lesão são a papilomatose e a acantose. As papilas dérmicas estão geralmente alongadas, estreitas e ramificantes, formando um padrão de pseudo-hiperplasia epiteliomatosa. O aspecto mais característico é a presença de coilócitos no estrato superior da camada espinhosa, nos estratos granuloso e córneo. Já o câncer anal era considerado uma doença pouco frequente, mas a sua incidência está crescendo, principalmente devido ao aumento do carcinoma de células escamosas (CCE). A relação causal entre esse vírus e o câncer do colo do útero

está bem caracterizada e o mesmo tem sido observado com o câncer anal.¹²

O diagnóstico das lesões malignas e pré-malignas do colo uterino, pênis e ânus pode ser realizado por citologia e histologia. Porém, a infecção por HPV é confirmada somente por meio de métodos moleculares que variam quanto a sua sensibilidade e especificidade,¹³ como a hibridização *in situ* (ISH), captura híbrida, imuno-histoquímica (IHQ), reação em cadeia de polimerase (PCR), *southern blot*, sequenciamento, entre outras.^{14,15}

A ISH é empregada para detecção e localização do HPV na célula infectada e permite localizar sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras celulares ou teciduais infectados, ou mesmo em cromossomos isolados, por meio da ligação de uma sonda específica (sequência curta de DNA) para um tipo de HPV, podendo ser executada em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina.^{14,16} Essa técnica é comumente utilizada no diagnóstico laboratorial de doenças genéticas ou por agentes infecciosos, como vírus, bactérias, fungos ou parasitas.

Uma variante da ISH é a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) que por meio de uma reação de peroxidase, permite a visualização do HPV em coloração amarronzada no núcleo da célula hospedeira. Sondas marcadas com a digoxigenina têm sido utilizadas desde a década de 1990 como uma alternativa não-isotópica, havendo relatos de sua superioridade entre as moléculas dessa classe, pois a reação de fundo é menor do que quando utilizada sonda marcada com a biotina.¹⁷ Após a ligação da sonda na sequência complementar

da célula, a visualização é feita ao microscópio de luz. A resolução da ISH dependerá do tamanho da sonda utilizada, do preparo apropriado das amostras e do treinamento do patologista na interpretação das amostras coradas. A ISH permite identificar o HPV na sua forma episomal, quando o DNA do HPV se encontra disperso pelo núcleo ou integrado, quando apresenta sinais pontuais. Essa técnica permite também estabelecer a correlação com os aspectos histopatológicos.¹⁸ Segundo Ming e cols. (2008),¹⁴ a técnica de ISH, aplicada em amostras de material fixado em formalina e embocado em parafina, poderá auxiliar nas seguintes ações: resolução dos diagnósticos discrepantes em pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais; diferenciação entre metaplasia escamosa endocervical imatura das neoplasias intraepiteliais de alto grau; células glandulares reativas das atípicas glandulares; avaliar o risco de progressão NIC ou de reincidência da doença em mulheres que foram tratadas para NIC 2/3 ou carcinoma; fornecer informações para pesquisa em câncer cérvico-vaginal.

É importante salientar que não foram estabelecidas guias de padronização para controles e procedimentos, limiares comuns ou conjunto de sondas para validação analítica da ISH para DNA de HPV, como foi relatado por UHLIG e cols. (2013).¹⁹ No trabalho de Bagarelli e Olinari (2004)²⁰ foi demonstrada alta especificidade e baixa sensibilidade quando da aplicação de ISH para o DNA do HPV, sendo pouco utilizada na rotina diagnóstica, mas com potencial para identificação do HPV de alto risco. O trabalho realizado por Montag e cols (2011)²¹ demonstrou que o limite de detecção, utilizando linhagem celular, seria de 10 a 50 cópias por célula e, em amostras fixadas

em formalina e incluídas em parafina, de 10 cópias de HPV por célula. Estudos mostram que devido a sua especificidade elevada, exames moleculares como a ISH e reação em cadeia da polimerase são as novas escolhas diagnósticas para detecção do HPV, tendo a hibridização vantagem, por ser realizada com cortes parafinados, mantendo a estrutura do tecido e possibilitando a observação das lesões.²²⁻²⁵ Outra vantagem para a associação de técnicas moleculares é sua sensibilidade na detecção do vírus.²¹⁻²³

O Núcleo de Patologia Quantitativa (NPQ) do Centro de Patologia (CPA) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) é responsável pela realização de exames biomoleculares para o diagnóstico de doenças de interesse em Saúde Pública, utilizando a patologia quantitativa e marcadores biológicos/moleculares na investigação de doenças infecciosas e neoplásicas (Decreto Estadual nº 55.601/2010).

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo apresentar a casuística das amostras de biópsia encaminhadas para o NPQ para confirmação do diagnóstico de infecção por HPV entre 2015 e o primeiro trimestre de 2018.

METODOLOGIA

Foram coletados dados clínicos de 67 amostras de biópsia de pacientes de ambos os sexos, com idade entre 2 a 67 anos, encaminhadas para diagnóstico anátomo-patológico no período de 2015 e o primeiro trimestre de 2018.

Todas as amostras foram fixadas em formalina, incluídas em parafina e

seccionadas em micrótomo (3µm), em lâmina silanizada para serem submetidas ao ensaio de hibridização *in situ* cromogênica (CISH).

As sondas comerciais de alto risco (HPV-AR 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82) e baixo risco (HPV-BR 6, 11) de escolha são marcadas com digoxigenina e o sistema de detecção utilizado foi o ZytoFast Plus CISH Implementation kit (T-1063-40, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha), adaptado às condições do laboratório.²⁵

Como controle das reações de alto (HPV-AR) e baixo risco (HPV-BR) foram utilizadas amostras com resultado positivo em análises anteriores. Após a reação, amostras que apresentaram precipitação de cor marrom castanha ao exame microscópico foram consideradas positivas. Por se tratar

de um estudo retrospectivo com amostras de arquivo, utilizadas para a rotina diagnóstica, justificamos a impossibilidade de obtenção de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo faz parte do projeto aprovado no conselho técnico-científico (CTC-IAL 11-J/2017) e no comitê de ética (CEPIAL parecer nº 2.439.900) do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS

Característica das amostras

Na casuística estudada, a topografia mais abundante encaminhada para confirmação do diagnóstico de infecção por HPV foi colo uterino (29 amostras, 43,3%), seguido de ânus (17 amostras, 25,4%), pênis (12 amostras, 17,9%), boca (quatro amostras, 6,0%) e vulva (três casos, 4,5%) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das amostras de biópsia recebidas no NPQ para diagnóstico de HPV entre 2015 e o primeiro trimestre de 2018

Topografia	n	%	Classificação	n	%
Colo	29	43,3	NIC-1	18	62,1
			NIC-2	5	17,2
			NIC-3	6	20,7
Ânus	17	25,4	Papiloma	13	76,5
			Carcinoma	2	11,8
			Displasia	1	5,9
			Hiperplasia	1	5,9
Pênis	12	17,9	Carcinoma	3	25
			Papiloma	8	66,7
			D. Liquenoide	1	8,3
Boca	4	6,0	Papiloma	3	75,0
			Hiperplasia	1	25
Vulva	3	4,5	NIV-1	1	33,3
			NIV-2	1	33,3
			NIV-3	1	33,3

NIC: neoplasia intraepitelial cervical; NIV: Neoplasia intraepitelial vulvar; D: dermatite.

Entre as amostras de colo uterino, 18 (62,1%) foram diagnosticadas como neoplasia intraepitelial de baixo grau (NIC-1), cinco (17,2%) como neoplasia intraepitelial de grau intermediário NIC-2 e seis (20,7%) amostras foram diagnosticadas como neoplasia intraepitelial de alto grau NIC-3 (Tabela 1). As pacientes possuíam idade entre 16 e 60 anos, com média de $31,7 \pm 12,6$ anos, com mínimo de 16 anos e máximo de 60 anos.

Treze (76,5%) amostras de ânus foram classificadas como papiloma, duas (11,8%) como carcinoma, uma (5,9%) como displasia e uma (5,9%) como hiperplasia (Tabela 1). Os pacientes, sendo 8 homens e 9 mulheres, apresentaram média etária de $31,3 \pm 19,3$ anos, com mínimo de 2 anos e máximo de 55 anos.

Do total das amostras de pênis, 8 (66,7%) foram classificadas como papiloma, três (25,0%) como carcinoma e uma como dermatite liquenoide (8,3%) (Tabela 1). Os pacientes apresentavam média etária de $31,5 \pm 7,9$ anos, com mínimo de 20 anos e máximo de 50 anos.

Com relação às amostras de boca, foram identificados três papilomas (75%) e uma (25%) hiperplasia (Tabela 1). Os pacientes (uma mulher e três homens) apresentaram média etária de $39,0 \pm 14,5$ anos, com mínimo de 22 anos e máximo de 55 anos.

As três amostras de vulva, foram classificadas como NIV-1, 2 e 3 (33,3%

respectivamente) (Tabela 1). As pacientes apresentaram média etária de $41,3 \pm 23,8$ anos, com mínimo de 20 e máximo de 67 anos.

CISH-HPV

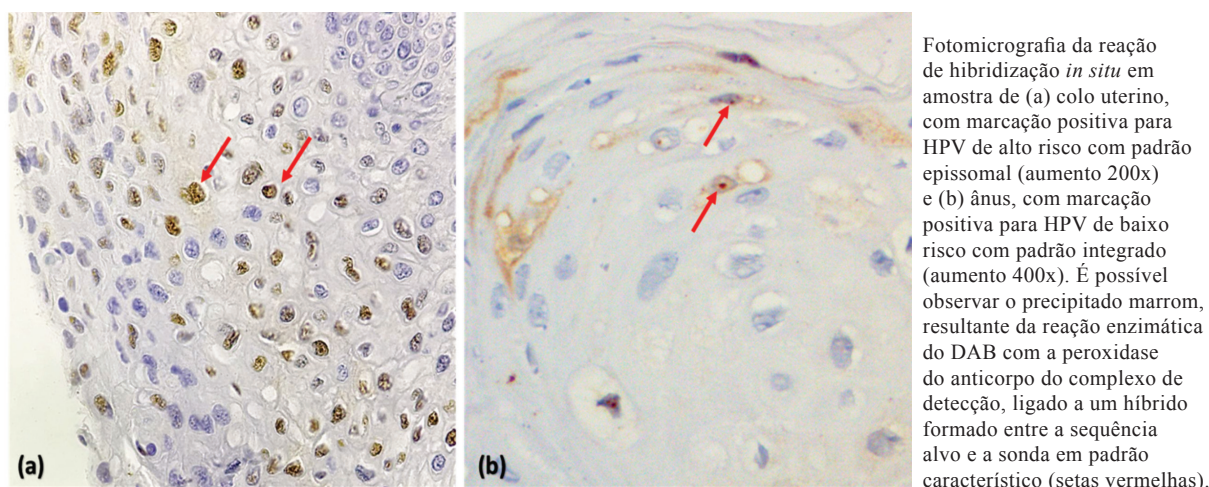
Das 67 amostras encaminhadas para diagnóstico, 18 (26,9%) apresentaram confirmação da infecção por HPV por meio da metodologia de CISH. Dentre estas amostras, 8 (44,4%) foram positivas para HPV-AR, 8 (44,4%) para HPV-BR e 2 (11,1%) exibiram positividade em ambas reações (Tabela 2).

A análise microscópica das lâminas de CISH também foi capaz de revelar o padrão de expressão do DNA viral presente nas células do tecido hospedeiro. O padrão de expressão epissomal foi o mais prevalente entre as amostras positivas (HPV-AR $n=5$, 41,7%; HPV-BR $n=7$, 58,3%) (figura 1). Entre as amostras positivas para HPV-AR, duas (25%) apresentaram padrão de expressão integrado e uma amostra (12,5%) apresentou padrão de expressão epissomal e integrado (misto). De forma semelhante, entre as amostras positivas para HPV-BR, uma (12,5%) também apresentou padrão de expressão misto, mas o padrão integrado não foi observado. Para as amostras que apresentaram positividade para ambas as sondas virais, foi observado o padrão epissomal (marcação HPV-AR) e misto (marcação HPV-BR) em uma delas e na outra apenas o padrão epissomal (HPV-AR e HPV-BR) (Tabela 2).

Tabela 2. Padrão de expressão do DNA viral nas amostras positivas para CISH-HPV

Padrão	Classificação	HPV-AR	HPV-BR	Topografia
- epissomal (HPV-AR) - misto (HPV-BR)	condiloma	POSITIVO	POSITIVO	pênis
- epissomal (HPV-AR) - epissomal (HPV-AR)	NIC-1	POSITIVO	POSITIVO	colo uterino
epissomal	condiloma	POSITIVO	negativo	pênis
epissomal	displasia	POSITIVO	negativo	ânus
misto	papiloma	POSITIVO	negativo	boca
epissomal	NIC-1	POSITIVO	negativo	colo uterino
epissomal	NIC-2	POSITIVO	negativo	colo uterino
integrado	NIC-3	POSITIVO	negativo	colo uterino
epissomal	NIV-2	POSITIVO	negativo	vulva
integrado	NIV-3	POSITIVO	negativo	vulva
epissomal	condiloma	negativo	POSITIVO	boca
epissomal	condiloma	negativo	POSITIVO	pênis
epissomal	condiloma	negativo	POSITIVO	pênis
epissomal	papiloma	negativo	POSITIVO	ânus
epissomal	papiloma	negativo	POSITIVO	ânus
misto	papiloma	negativo	POSITIVO	ânus
epissomal	NIC 1	negativo	POSITIVO	colo uterino
epissomal	NIV-1	negativo	POSITIVO	vulva

HPV-AR: HPV de alto risco; HPV-BR: HPV de baixo risco; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; NIV: Neoplasia intraepitelial vulvar

**Figura 1.** Padrão de expressão epissomal e integrado em amostra positiva para HPV de alto risco

DISCUSSÃO

A infecção por HPV pode causar verrugas no epitélio cutâneo e anogenital, além de estar relacionada a várias formas de câncer em homens e mulheres.²⁶ A detecção do vírus, bem como a identificação da integração com o material genético do hospedeiro, são informações importantes para a decisão de abordagem terapêutica e manejo do paciente.

No presente trabalho, os casos submetidos à reação de hibridização *in situ* cromogênica utilizando sondas de alto e de baixo risco para detecção de DNA-HPV, apresentaram positividade em 18 dos 67 casos analisados (26,9%). A ISH é considerada um método de boa especificidade, porém de baixa sensibilidade, segundo Tying e cols. (2000).²⁷ Entretanto, esta técnica tem a vantagem de demonstrar a informação genética específica dentro do contexto morfológico da lesão, com grande aplicabilidade em materiais fixados e parafinizados.²⁸

É importante salientar que a detecção do HPV em técnicas moleculares depende de inúmeros fatores pré-analíticos que podem comprometer o resultado como qualidade da amostragem, ou seja, se o material coletado de fato representa a lesão em dimensão e profundidade, erros de amostragem podem produzir inconsistências, mesmo em ensaios sensíveis. Van Ham e cols. (2002)⁵ demonstraram que o ciclo menstrual também influencia a carga viral na cérvix uterina, impactando diretamente no limite de detecção dos ensaios moleculares. Segundo o grupo, o período do ciclo menstrual relacionado aos maiores índices de detecção viral é a fase folicular (entre o 7º e 11º dias). As condições de transporte e armazenamento da

amostra, bem como a qualidade do fixador, tempo excessivo ou insuficiente de fixação, recipiente inadequado para fixação e/ou volume insuficiente do fixador pode interferir tanto no diagnóstico como na pesquisa em patologia molecular, afinal o ácido nucleico viral precisa estar preservado e íntegro para evitar resultados falso negativos.

Testes moleculares em amostras incluídas em parafina são mais difíceis de serem analisadas devido ao estado de degradação do DNA, que é maior quando comparado ao DNA de amostras frescas, nas quais o DNA se encontra mais íntegro.¹⁶ Existe ainda a possibilidade do tipo de HPV contido na amostra não ser contemplado na sonda utilizada na reação.

Aproximadamente 30-60% dos carcinomas penianos são relatados como HPV positivos.²⁹ O vírus afeta o epitélio escamoso da genitália masculina da mesma forma que o feminino. Bezerra e cols. (2001)³⁰ mostrou em um estudo com 82 pacientes com carcinomas penianos que 30,5% eram positivos para HPV DNA, sendo o HPV 16 o mais prevalente, em 16% dos casos. O prognóstico para carcinomas penianos positivos para HPV é controverso, mas alguns estudos mostram que para essa neoplasia, o HPV sinaliza um bom prognóstico. Nesse mesmo trabalho, demonstrou-se que pacientes com HPV sofrem menos embolização linfática. Lont e cols. (2006),³¹ em um estudo com 176 homens, obteve 31% de positividade e concluiu que as características histopatológicas preditivas para metástase ganglionar, profundidade da invasão e embolização linfática não estão relacionados à presença do HPV. Os trabalhos relatados apresentam valores de positividade semelhantes aos observados no

presente trabalho, no qual 33,33% das amostras de biópsias de pênis apresentaram reação positiva para a sonda de HPV.

O HPV é associado com 80-85% dos cânceres anais. A soroprevalência é de 2 a 6 vezes maior em homens que fazem sexo com homens do que homens que fazem sexo com mulheres.³² Esses fatos têm motivado a inclusão dessa doença como sexualmente transmissível, o que justifica a necessidade de se adotar medidas de vigilância nas clínicas de doenças sexuais, ginecológicas e urológicas.³³

É importante destacar que a infecção por HPV lista como agente causal de um subgrupo de carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço que vem aumentando nos últimos anos e acometendo pessoas jovens e não fumantes. Quando há presença viral na neoplasia, o perfil clínico patológico diverge dos tumores convencionais, apresentando bom prognóstico e permitindo uma terapêutica menos agressiva, preservando a área acometida.^{34,35} No presente trabalho, 50% das amostras avaliadas de cavidade oral apresentaram detecção de DNA viral, o que do ponto de vista clínico indicaria um protocolo de manejo diferente entre esses casos.

Quanto ao padrão físico do HPV, Bagarelli e Olani (2004),²⁰ considerando somente os casos positivos na ISH, a maior frequência dos padrões integrados (somados os isolados e os mistos) foram observados nas lesões intraepiteliais de alto grau, corroborando os achados de Gómez e cols. (1996)³⁶ e Pirami

e cols (1997),³⁷ que também observaram maior frequência de integração do DNA do HPV nas lesões com alto grau de atipias, o que reforça a noção de que a integração possa ser um fator de risco para a progressão da lesão. Diante dos pacientes com diagnóstico suspeito de HPV pelos métodos tradicionais, a realização de exames de hibridização molecular poderá auxiliar no diagnóstico, tratamento e prognóstico, principalmente para o reconhecimento das cepas de HPV do grupo de alto risco e a seleção daqueles pacientes com real risco de câncer.²⁰ A implantação dessa metodologia para o estudo do HPV em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina viabiliza o desenvolvimento de futuros estudos para identificação de outros agentes infecciosos e contribuirá definitivamente na rotina diagnóstica e na pesquisa clínica.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram a importância da metodologia de hibridização *in situ* no diagnóstico de HPV, pois, além de ser uma técnica bastante versátil (na qual é possível utilizar uma ampla variedade de amostras teciduais), promove resultados específicos e complementares à histopatologia. Em especial, a distinção entre os subtipos de HPV (alto e baixo risco) e o estado físico do vírus (epissomal, integrado ou misto) possuem um impacto positivo direto no gerenciamento clínico e/ou tratamento e prognóstico dos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus res.* 2017;231:119-27.
2. Lorenzi AT, Syrjänen KJ, Longatto-Filho A. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden.

- A Brazilian perspective. *Virology journal*. 2015 Dec;12(1):112.
3. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. med. virol.* 2015;25:2-23.
 4. Oliveira CM, Levi JE. The Biological Impact of Genomic Diversity in Cervical Cancer Development. *Acta cytol.* 2016; 60(6):513-17.
 5. Van Ham MAPC, Melchers WJG, Hanselaar AGJM, Bekkers RLM, Boonstra H, Massuger LFAG. Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br. j. cancer.* 2002; 87(4):373-76.
 6. International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon, France: World Health Organization; 1995. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.;64.
 7. Souza N, Melo V, Castro L. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Rev. bras. ginecol. obstet.* 21;23(6):355-61.
 8. Tavassoli F, Deville P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC Press. p. 233-6, 2003.
 9. Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo: BG Cultural; 2000.
 10. Downes MR. Review of in situ and invasive penile squamous cell carcinoma and associated non-neoplastic dermatological conditions. *J. clin. pathol.* 2015; 68:333-40.
 11. Linhares AC, Villa LL. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). *J Pediatr.* 2006 Jul;82(3):25-34.
 12. Modesto VL, Gottesman L. Sexually transmitted diseases and anal manifestations of AIDS. *Surg. clin. North America.* 1994;74(6):1433-64.
 13. Zaravinos A, Mammias IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. j. biol. markers.* 2009; 24(4):215-22.
 14. Ming Guo, Gong Y, Deavers M et al. Evaluation of a Commercialized In Situ Hybridization Assay for Detecting Human Papillomavirus DNA in Tissue Specimens from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. *J. clin. microbiol.* 2008; 46(1):274-80.
 15. Steinau M, Onyekwuluje JM, Scarbrough MZ et al. Performance of Commercial Reverse Line Blot Assays for Human Papillomavirus Genotyping. *J. clin. microbial.* 2012; 50(5):1539-44.
 16. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies current technology for human papillomavirus dna detection of genital infections. v.31, p.80-8, 2003.
 17. Siadat-Pajouh M, Ayscue Ah, Periasamy AHB. Introduction of a fast and sensitive fluorescent in situ hybridization method for single-copy detection of human papillomavirus (HPV) genome. *J. histochem. cytochem.* 1994; 42(11):1503-12.
 18. Vidal FCB, Nascimento MDSB, Ferraro CTL, Brito LM. Análise crítica dos métodos moleculares. *Femina.* 2012; 40:263-7.
 19. Uhlig K, Earley A, Lamont J, Dahabreh IJ, Avendano EE, Cowan JMFS. Fluorescence in situ hybridization (FISH) or other in situ hybridization (ISH) testing of

- uterine cervical cells to predict precancer and cancer. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality. Technology Assessment Report; 2013.
20. Bagarelli LB, Oliani AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. Human Papillomavirus Typing and Physical State by *in situ* Hybridization in Uterine Cervix Intraepithelial Lesions. *Trabalhos Originais*. 2004; 26(261):59-64.
 21. Montag M, Blankenstein TJ, Shabani N, Bruning A, Mylonas I. Evaluation of two commercialised *in situ* hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. gynecol. obstet*. 2011; 284(4):999-1005.
 22. Warford A. *In situ* hybridisation: technologies and their application to understanding disease. *Prog. histochem. cytochem*. 2016; 50(4):37-48.
 23. Laabidi B, Ben Rejeb S, Bani A, Mansouri N, Lamine O, Bouzaini A et al. Human papillomavirus detection using *in situ* hybridization and correlations with histological and cytological findings. *Med. mal. infect*. 2016; 46(7):380-84.
 24. Mendez-Pena JE, Sadow PM, Nose V, Hoang MP. A chromogenic *in situ* hybridization assay with clinical automated platform is a sensitive method in detecting high-risk human papillomavirus in squamous cell carcinoma. *Hum. pathol*. 2017; 63:184-9.
 25. Kimura LM, Shirata NK, Nonogaki S, Guerra JM, Oyafuso MS, Menezes Y, et al. Padronização do protocolo de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para detecção de HPV de alto e baixo risco com a utilização da sonda comercial marcada com digoxigenina. *BEPA, Bol. epidemiol. paul*. 2017; 14:1-11.
 26. Molijn A, Jenkins D, Chen W, Zhang X, Pirog E, Enqi W, et al. The complex relationship between human papillomavirus and cervical adenocarcinoma. *Int. j. cancer*. 2016; 138(2):409-16.
 27. Tyring Sk. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2000; 43(1):18-26.
 28. Birner P, Bachtiry B, Dreier B et al. Signal-Amplified Colorimetric *In Situ* Hybridization for Assessment of Human Papillomavirus Infection in Cervical Lesions. *Mod. pathol*. 2001; 14(7):702-9.
 29. Sarkar FH, Miles BJ, Plieth DHCJ. Detection of human papillomavirus in squamous neoplasm of the penis. *J. urol*. 1992; 143(2):389-92.
 30. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH et al. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*. 2001; 91(12):2315-21.
 31. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int. j. cancer*. 2006; 119:1078-73.
 32. Lu B, Viscidi RP, Lee JH, Wu Y, Villa LL, Lazcano-Ponce E, et al. Human papillomavirus (HPV) 6, 11, 16, and 18 seroprevalence is associated with sexual practice and age: results from the multinational HPV Infection in Men Study (HIM Study). *Cancer epidemiol. biomark. prev*. 2011; 20(5):990-1002.
 33. Markos A. The presentation of anogenital cancers as sexually transmissible infection: a case for vigilance. *Sex. health*. 2007; 4(1):79-80.
 34. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus *in situ* hybridization

- and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010; 116(9):2166-73.
35. 35. Jitani AK, Raphael V, Mishra J, Shunyu NB, Khonglah Y, Medhi J. Analysis of human papilloma virus 16/18 DNA and its correlation with p16 expression in oral cavity squamous cell carcinoma in North-Eastern India: A chromogenic in-situ hybridization based study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(8):EC04-EC07.
36. 36. Gómez F, Picazo A, Roldán M, Corcuera MT, Curiel I, Munoz E, et al. Labelling pattern obtained by non-isotopic in situ hybridization as a prognostic factor in HPV-associated lesions. *J. pathol*. 1996: 179(3):272-5.
37. 37. Pirami L, Giache V, Becciolini A. Analysis of HPV1 6, 18, 3 1, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J. clin. pathol*. 1997; 50:600-4.
-
-

Correspondência/Correspondence to:

Leonardo José Tadeu de Araújo
Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz
Avenida Doutor Arnaldo nº 355 – 7º andar – Laboratório 705 - Cerqueira César – CEP 01246-902, São Paulo, SP
Tel.: 11-3068-2874, fax 11-3068-2871
E-mail: biomedleonardo@gmail.com ou patomol.ial@gmail.com