

Artigo original

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

Standardization of the chromogenic in situ hybridization protocol for searching the high and low risk HPV using a commercial probe labeled with digoxigenin

Lidia Midori Kimura;¹ Neuza Kasumi Shirata;¹ Suely Nonogaki;¹ Juliana Mariotti Guerra;¹ Marina Suheko Oyafuso;^{II} Yara de Menezes;^{II} Leonardo José Tadeu de Araújo;¹ Celso di Loreto^{II}

¹Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. ^{II}Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

RESUMO

Introdução: A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada o maior fator de risco para desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino e câncer de vagina, vulva, pênis, ânus, entre outros. **Objetivo:** Implementar o protocolo comercial de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) com sonda (*cocktail*) comercial marcada com digoxigenina para pesquisa de HPV de alto risco (HPV-AR) e de baixo risco (HPV-BR) em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. **Material e método:** Foi realizada CISH em 83 amostras de biópsias de colo uterino, 38 HPV-BR (6, 11) e 45 HPV-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82); dez pênis; 11 canal anal e cinco prepúcio, em blocos histológicos fixadas em formalina e incluídas em parafina com alterações sugestivas da presença de HPV. Foram testados cinco protocolos diferentes para as duas sondas, modificações no tempo (t) e temperatura (T) para: hibridização, proteólise, incubação com o sistema de detecção. **Resultados:** Ao aumentar t de proteólise de 3 min a 37 °C para 10 min a 37°C (HPV-AR e HPV-BR), as marcações das células infectadas tornaram-se visivelmente mais nítidas. O mesmo ocorreu alterando-se o t da hibridização de 60 min a 37°C para 120 min a 37°C, assim como t de incubação com o sistema de detecção, de 30 min a 37°C para 60 min a 37°C. **Conclusão:** O protocolo implementado mostrou-se adequado para amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, para as condições de laboratório público.

PALAVRAS-CHAVE: Colo do útero. Pênis. Sondas de DNA de HPV. Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

Introduction: Infection with human papillomavirus (HPV) is considered the major risk factor for developing cancer and precancerous lesions of cervix, penis, anus, among others. **Objective:** To implement the chromogenic *in situ* hybridization (CISH) protocol with commercial probe for HPV of high risk (HR-HPV) (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82) and of low risk (LR-HPV) (types 6, 11) in formalin-fixed and paraffin-embedded samples. **Material and method:** CISH were performed on biopsy samples with morphological changes suggestive of HPV, selected from the file of Pathology Center of Adolfo Lutz Institute. Thirty-eight cervical, 10 penile, 11 anal canal and five foreskin samples were analyzed for both HPV-LR and HR. Five different protocols were tested for the two probes, following modifications in the running time (t) and temperature (T) steps for hybridization, proteolysis, incubation with the detection system. **Results:** In current study, the increase of t and T parameters to proteolysis and incubation with the detection system, for the both probes, raised the labeling in the infected cells. LR-HPV probe was positive in 6.5 % of CIN 1 and in 60.0 % of penile with condyloma accuminata. HR-HPV probe was positive in 18.5 % of cervix and 7.4 % of penile samples. Two cases (one cervix and one penis) were positive for both probes. **Conclusion:** The implemented protocol proved to be suitable for the samples fixed in formalin and embedded in paraffin, for the public laboratory conditions.

KEYWORDS: Cervix uteri. Penile. HPV DNA Probes. *In situ* hybridization.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) é considerada o maior fator de risco para desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino. O DNA do HPV é encontrado em mais de 90% das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do cérvix uterino podendo ser classificado como sendo de alto e baixo risco oncogênico.¹ Além disso, esse vírus também é um importante fator de risco para outros tipos de câncer como o de vagina, vulva, pênis, ânus e nasofaringe.¹

A classificação dentro de uma mesma espécie de HPV é baseada na homologia de seu genoma, e atualmente já foram

identificados mais de 200 tipos de HPV que são antigenicamente semelhantes. Cerca de 40 tipos de HPV têm acometido a região anogenital, dos quais, aproximadamente, 18 são oncogênicos: HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 63, 66, 68 e 82.² Doze tipos de HPV são classificados como carcinogênicos da Classe I (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), um da Classe 2A (HPV 68) e cinco da Classe 2B (26, 67, 69, 73, 82).³ Os HPVs 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco ou sem qualquer risco oncogênico, sendo responsáveis pelo aparecimento das verrugas genitais.¹⁻⁴

Todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Nas lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros. Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral, que ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda da função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, ocasionando uma super-expressão desses genes NE em uma transformação da célula hospedeira, que anula a função supressora do p53 e Rb, levando à perda do controle de ciclo celular.²⁻⁷

Atualmente estão disponíveis no mercado várias técnicas moleculares para detecção do HPV que variam quanto a sua sensibilidade e especificidade,⁸ como a hibridização *in situ* (ISH) e suas variantes, captura de híbridos (CH), imuno-histoquímica (IHQ), reação em cadeia pela polimerase (PCR), *southern blot*, sequenciamento, *reverse line blot*, entre outras.^{7,9}

A técnica de ISH tem sido empregada para detecção e localização do HPV na célula infectada. Essa metodologia permite localizar sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras celulares ou teciduais, podendo assim mostrar a localização do DNA ou RNA viral de forma específica na célula infectada ou mesmo em cromossomos isolados, por meio da ligação de uma sonda específica (sequência curta de DNA) para um tipo de HPV, podendo ser efetuado em lâminas de vidro, com tecido fixado em formalina e incluídos em parafina.^{4,6,7}

As sondas podem estar marcadas com compostos fluorescentes na hibridização *in situ* (hibridização *in situ* fluorescente, FISH)

ou com biotina, digoxigenina ou dinitrofenol.¹⁰ Sondas marcadas com a digoxigenina têm sido utilizadas desde a década de 90 como uma alternativa não isotópica, havendo relatos de sua superioridade entre as moléculas dessa classe, pois a reação de fundo é maior com a utilização de sondas marcadas com a biotina.¹¹

Uma variante da ISH é a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) que, meio de uma reação da diaminobenzidina (DAB), substrato cromogênico e a peroxidase, permite a visualização do HPV no núcleo com aspecto amarronzado ou como pontos amarronzados na célula hospedeira.

Após a ligação da sonda na sequência complementar da célula, a visualização é feita ao microscópio de fluorescência na FISH ou usando luz direta na CISH. 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 encontra-se disperso pelo núcleo ou integrado, apresentando sinais pontuais.¹²

É importante lembrar 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 et al.¹²

Bagarelli et al.¹³ demonstraram em seu estudo que a ISH mostrou alta especificidade e baixa sensibilidade, sendo pouco utilizada na rotina diagnóstica, mas como auxiliar para outras técnicas como a hematoxilina & eosina (H&E), IHQ, e por apresentar elevado potencial na identificação de HPV de alto risco.

Montag et al.¹⁴ mostraram que o limite de detecção, utilizando linhagem celular, foi de 10 a 50 cópias por célula, porém em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina de 10 cópias de HPV por célula.

O objetivo deste estudo foi implementar o protocolo de hibridização *in situ* de sonda (*cocktail*) comercial marcada com digoxigenina para detecção de HPV de alto e baixo risco em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, com o intuito de aprimorar a metodologia na rotina diagnóstica do Núcleo de Patologia Quantitativa – Instituto Adolfo Lutz, quando comparado aos resultados obtidos com o protocolo original.

MATERIAL E MÉTODO

Selecionamos para este estudo amostras de biópsias de colo uterino e pênis, canal anal e prepúcio, selecionados do arquivo de blocos do Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, advindas de diferentes Unidades Básicas de Saúde do Estado de São Paulo. As amostras apresentaram alterações morfológicas sugestivas da presença do HPV por meio da coloração de H&E. Todas as amostras foram fixadas em formalina e incluídas em parafina e novos cortes com espessura de 5 µm foram obtidos para a reação de CISH.

Foram submetidas 83 amostras de colo uterino, sendo 38 para HPV de baixo risco (HPV-BR) (tipos 6, 11) e 45 para HPV de alto risco (HPV-AR). Dez amostras de pênis, 11 de canal anal e 5 de prepúcio foram incluídas neste estudo, para análise com a sonda de HPV-AR e BR.

Os HPV-BR testados neste estudo foram os tipos 6 e 11; HPV-AR os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82, utilizando sonda ZytoFast (ZytoFast HPV High-Risk Digoxigenin-labeled, T-1140-400; ZytoFast HPV type 6/11 Digoxigenin-labeled, T-1055-400; ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha) e reveladas com o ZytoFast Plus CISH Implementation kit (T-1063-40, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha).

Testamos cinco protocolos diferentes para as duas sondas, com modificações em relação ao tempo e temperatura nas seguintes etapas da reação, conforme descrito na Tabela 1:

- proteólise (3 ou 10 minutos a 37°C);
- hibridização (60 minutos a 37°C, 120 minutos a 55°C ou 37°C);
- incubação com o sistema de detecção (30 ou 60 minutos a 37°C).

Tabela 1. Distribuição dos parâmetros de tempo e temperatura de proteólise, hibridização, incubação com o sistema de detecção, nas amostras parafinadas submetidas à reação de CISH utilizando HPV-AR

Tempo e temperatura de proteólise	Tempo e temperatura de hibridização	Tempo e temperatura de incubação com o sistema de detecção (cada etapa)
3 min a 37°C	60 min a 37°C	30 min a 37°C
3 min a 37°C	120 min a 55°C	30 min a 37°C
3 min a 37°C	120 min a 37°C	30 min a 37°C
10 min a 37°C	120 min a 37°C	30 min a 37°C
10 min a 37°C	120 min a 37°C	60 min a 37°C

Primeiramente foi realizada a padronização de protocolo de reação para a sonda de HPV-AR (Tabela 1) e os parâmetros obtidos foram utilizados para o HPV-BR (Tabela 2).

Até a segunda etapa foi utilizado o mesmo protocolo para as duas sondas conforme descrito abaixo:

1. Desnaturação, desparafinização, alcoolização e hidratação das amostras – as amostras foram desnaturadas por 10 min a 70°C no hibridizador automático para lâminas (Dako, S2450, Glostrup, Denmark), desparafinizadas em xilol e imersão em banhos com álcoois seriados decrescentes, até a lavagem em água corrente e destilada;
2. Bloqueio da peroxidase endógena – solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 6% v/v por 10 min;
3. Na etapa da proteólise foram modificados os itens, tempo e a temperatura conforme demonstrado na Tabela 01 – Proteólise – solução de pepsina (ZytoFast Plus CISH Implementation Kit HRP-DAB, T-1063-40). A enzima foi eliminada por meio da lavagem das lâminas em água corrente e destilada por 10 min;
4. Eliminação da reação de fundo – Heat Pretreatment Solution EDTA (kit) em banho maria a 95°C por 15 min. As lâminas foram imediatamente mergulhadas em água deionizada por 1 min;
5. A sonda foi colocada no agitador de tubos por 30 s e deixada em repouso por 5 min sobre o gelo. Foi aplicada 10 µL da sonda sobre o corte histológico, coberto com lamínulas limpas em álcool, seladas com silicone (FixoGum, Marabu GmbH & Co, Bietigheim-Bissingen, Alemanha) e colocadas no hibridizador;
6. As amostras foram desnaturadas a 75°C por 5 min e hibridizadas por tempo e temperatura conforme Tabela 2;
7. Pós-hibridização – o selante e a lamínula foram removidos e as lâminas foram mergulhadas em tampão de lavagem (kit) a 55°C por 5 min e seguida de lavagem em tampão a temperatura ambiente;
8. Detecção – foi aplicado anticorpo anti-digoxigenina (kit) e em seguida o polímero marcado com peroxidase (kit), conforme tempo e temperatura indicados na Tabela 2;

Tabela 2. Distribuição dos parâmetros de tempo e temperatura de proteólise, hibridização, incubação com o sistema de detecção, nas amostras parafinadas submetidas à reação de CISH utilizando HPV-BR (6/11)

Tempo e temperatura de proteólise	Tempo e temperatura de hibridização	Tempo e temperatura de incubação com o sistema de detecção (cada etapa)
3 min a 37°C	60 min a 37°C	30 min a 37°C
3 min a 37°C	120 min a 55°C	30 min a 37°C
10 min a 37°C	120 min a 37°C	30 min a 37°C
10 min a 37°C	1260 min (21 h) a 37°C	60 min a 37°C

9. Revelação com o cromógeno – o DAB foi preparado conforme as recomendações do fabricante e aplicado sobre os cortes histológicos e incubados por 20 min a 37°C;

10. Contra coloração e montagem – com hematoxilina de Harris, diferenciação em água amoniacal, desidratação em álcool seriado crescente e montagem com meio permanente;

Aspectos morfológicos

A visualização de sinais foi observada por meio do microscópio de luz (Olympus CX22LED, Olympus Co., Tokyo, Japão) utilizando objetivas com aumento de 10x e 40x, em que foram verificadas marcações nucleares corados de marrom dourado. Foi considerado positivo para HPV quando observados nos núcleos a marcação difusa apontando para a forma epissomal do vírus e pontual na integração do DNA-HPV no genoma celular.

Em todos os protocolos foram incluídos controles positivos. O controle negativo foi realizado pela sonda DNA negativa do kit descrito acima.

Comitê de ética

Este projeto tem aprovação pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, sob nº projeto CTC 36E/2013.

RESULTADOS

Foram observados os seguintes resultados após a aplicação dos diferentes protocolos:

Nas amostras que foram submetidas à reação de HPV-BR, encontramos positividade em:

03/38 (7,9%) casos de colo uterino; 07/10 (70,0%) de pênis.

Em relação à sonda de HPV-AR, foram observadas positividade nas seguintes amostras: 20/45 (44,4%) casos de colo uterino e 02/10 (20%) de pênis.

Foi observada positividade simultânea para HPV-AR e HPV-BR em duas amostras, sendo uma de colo uterino e uma de pênis.

A primeira reação realizada apresentou positividade fraca, tanto no HPV-BR e AR, que nos levou a realizar alterações no protocolo de reação, nos parâmetros tempo e temperatura, conforme demonstrada nas Tabelas 1 e 2.

Observamos que quando aumentamos o parâmetro tempo de proteólise de 3 min a 37°C para 10 min a 37°C, tanto nos casos de HPV-AR e HPV-BR, as marcações das células infectadas tornaram-se visivelmente mais nítidas. O mesmo ocorreu quando alteramos o fator tempo de hibridização de 60 min a 37°C para 120 min a 37°C, assim como para o tempo de incubação com o sistema de detecção, de 30 min a 37°C para 60 min a 37°C.

Quando alteramos a temperatura de hibridização para 55°C, verificamos que a sonda para HPV-AR não mostrou variação no resultado, o que não ocorreu com a sonda de HPV-BR.

Uma das amostras descolou da lâmina durante o procedimento, tendo sido necessária a repetição, por quatro vezes. Atribuímos o descolamento dos cortes histológicos à fixação inadequada na fase pré-analítica, visto que o descolamento foi observado apenas nesta amostra, não foi considerado decorrente da reação de CISH.

Tabela 3. Distribuição topográfica das amostras parafinadas com a reação de CISH para HPV-AR e HPV-BR em amostras de colo uterino, pênis, canal anal e prepúcio

Topografia	HPV-AR (+)	(%)	HPV-AR (-)	(%)	HPV-BR (+)	(%)	HPV-BR (-)	(%)
Colo uterino	20/45	44,4	25/45	56,5	03/38	7,9	35/38	92,1
Pênis	02/10	20,0	08/10	80,0	07/10	70,0	03/10	30,0
Canal anal	-	-	11/11	100,0	-	-	11/11	100,0
Prepúcio	-	-	05/05	100,0	-	-	05/05	100,0

DISCUSSÃO

No mercado existem sondas comerciais marcadas com biotina e digoxigenina. A escolha técnica pelas sondas marcadas com digoxigenina foi baseada em relatos de publicações científicas que demonstraram melhor qualidade da reação, quando comparada com o uso da sonda biotinilada, em que podemos observar a reação de fundo mais evidente nas amostras, prejudicando assim a leitura,^{10,11} além da evolução observada na IHQ em que os complexos avidina-biotina foram gradativamente substituídos pelos polímeros.¹⁵

A baixa sensibilidade encontrada neste estudo em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina corrobora com vários trabalhos publicados.^{14,16}

Apesar de a ISH ser um método considerado de baixa sensibilidade, é um dos métodos de identificação da localização exata do HPV na célula, elevando assim a especificidade do método.¹⁷ Também poderá auxiliar na distinção do DNA episomal da fração integrada na célula, podendo assim determinar o *status* da doença.^{18,19}

Como já descrito anteriormente, Montag et al.¹⁴ descreveram em seu estudo que, nas amostras fixadas em formalina e incluídas

em parafina, o limite de detecção seria de aproximadamente 10 cópias de DNA-HPV por célula. Desta forma, acreditamos que algumas das amostras negativas da nossa casuística possam ser atribuídas ao número de cópias inferiores ao limite de detecção da sonda.

Este estudo permitiu localizar dois casos com positividade para o HPV-AR e BR, mostrando a aplicabilidade desse método nesse tipo de amostras.

Verificamos que o fator tempo e temperatura foram parâmetros importantes na reação, pois auxiliaram na determinação das marcações celulares positivas, minimizando assim os falsos-negativos. Acreditamos que estes parâmetros tenham influenciado no resultado da reação, pois a estabilidade do híbrido formado pode ser modulada não só pela natureza e comprimento das sequências, mas também pela temperatura da reação e concentração salina da solução de hibridização.³ Estes parâmetros, entre outros, podem definir o rigor da reação, fator determinante da especificidade e sensibilidade dos ensaios.⁴

No trabalho de Montag et al.¹⁴ os autores utilizaram sondas semelhantes ao deste estu-

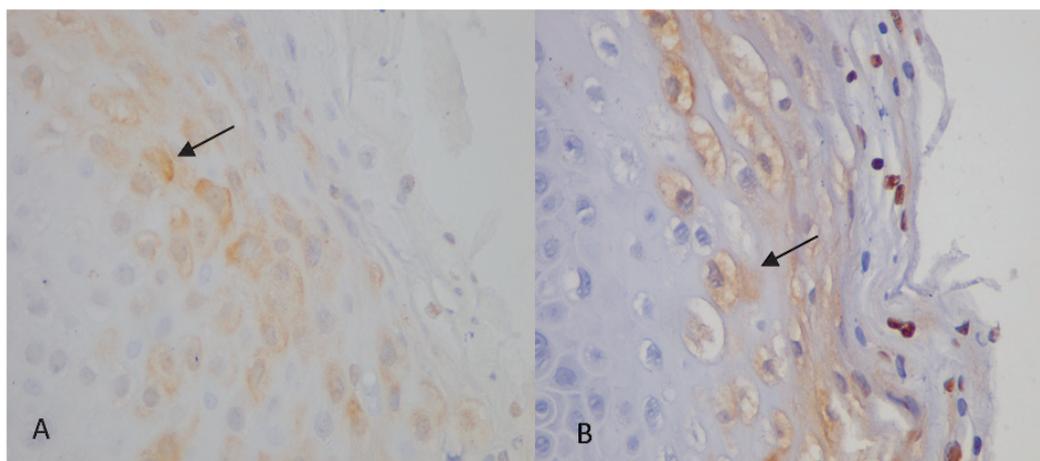
do (ZytoFast), porém marcadas com biotina e protocolo diferente de proteólise por 30 min a 37°C; tempo de hibridização de 1h e 29 min a 37°C; e no sistema de detecção por 40 min a 37°C. Em nosso estudo observamos, pela visualização microscópica, que o melhor protocolo de tempo e temperatura para proteólise, hibridização e incubação, com o sistema de detecção para a sonda de HPV-AR, foi de: 10 min a 37°C; 120 min a 37°C; 60 min a 37°C e para HPV-BR: 10 min a 37°C; 1260 min (21 h) a 37°C; 60 min a 37°C (Figuras 1 e 2).

A qualidade da fixação e do processamento das amostras também pode influenciar nos resultados da ISH, conforme relatado em outros trabalhos.^{4,20} Estes dados corroboraram com os achados deste estudo em que amostras fixadas ou processadas inadequadamente apresentaram descolamento no processo da reação, e foram retiradas da nossa casuística.

Além da aplicabilidade, a implantação da técnica de ISH em um laboratório de anatomia patológica, quando comparada a PCR, é

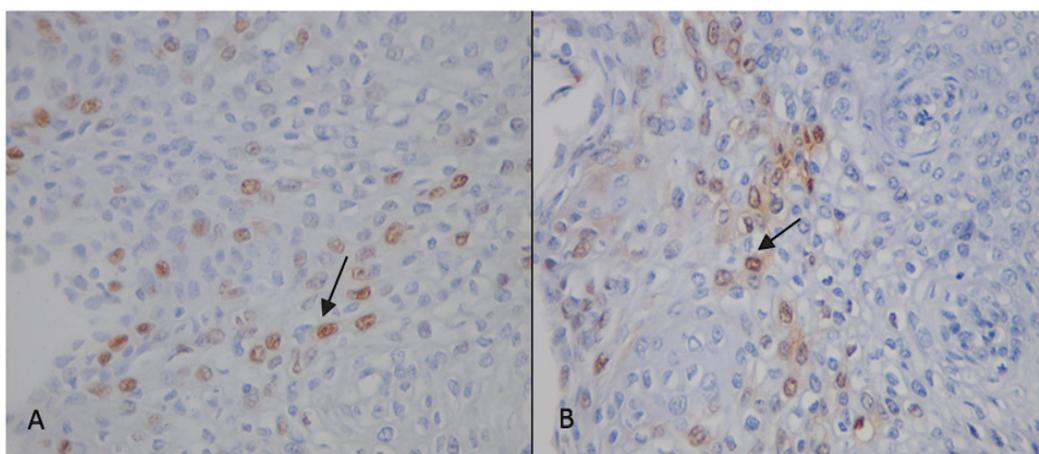
metodológica e financeiramente mais viável, pelas seguintes considerações:

- por apresentarem etapas comuns às de coloração H&E, especiais e IHQ, principalmente esta última;
- um profissional treinado para execução da reação IHQ poderá facilmente aprender a ISH;
- não há necessidade de aquisição de um novo parque de equipamentos (termociclador, extrator e quantificador de ácidos nucleicos, cuba e fonte para eletroforese, cabine de PCR, centrífuga, banho seco, luminômetro, autoclave). O investimento seria no hibridizador automático de lâminas. Os outros equipamentos necessários, tais como a estufa de secagem e cultura, capela de segurança química, panela de pressão, fogareiro elétrico já estão disponíveis em laboratórios de anatomia patológica que realizam a IHQ;
- necessidade de áreas físicas distintas para execução das diferentes etapas dos procedimentos moleculares.



BR – baixo risco; AR – alto risco; P=Proteólise; H=Hibridização; SD=Sistema de detecção; DAB=Cromógeno

Figura 1. Caso de CISH positivo para HPV-BR em amostra de pênis (aumento de 40x) vide seta. A-Utilizando parâmetro P 3 min a 37°C; H 18h a 37°C ; SD 30 min a 37°, DAB 20 min a 37°C. B-Utilizando parâmetro P 10 min a 37°C; H 1260 min (21 h) a 37°C; SD 60 min a 37°C; DAB 20 min a 37°C



BR – baixo risco; P=Proteólise; H=Hibridização; SD=Sistema de detecção; DAB=Cromógeno

Figura 2. Caso de CISH positivo para HPV-AR em amostra de colo uterino (aumento 40x) vide seta. A-Parâmetros P 3 min a 37°C; H 2h a 37°C; SD 30 min a 37°C; DAB 20 min a 37°C. B-Parâmetro P 10 min a 37°C; H 2h a 37°C; SD 1h a 37°C; DAB 20 min a 37°C

CONCLUSÕES

As sondas ZytoFast, um cocktail de sondas marcadas com digoxigenina, mostraram-se adequadas para amostras fixadas com formalina e incluídas em parafina, após modificações dos parâmetros tempo e temperatura, que auxiliaram na melhora da visualização microscópica das áreas marcadas com as respectivas sondas.

Outro fator que nos levou pela escolha desta sonda e kit de revelação foi o fator custo. O kit utilizado tem fornecido a solução de pré-tratamento, a solução enzimática pronta para uso, tampão de lavagem, sondas controles DNA e RNA positivos e negativos, anticorpo anti-digoxigenina, polímero marcado com peroxidase, cromógeno, substrato cromogênico, que facilitaram na padronização das reações. Considerando os custos envolvidos na aquisição dos produtos acima listados, separadamente, oneraria ainda mais os testes, portanto, acreditamos que este produto foi o que ofereceu melhor custo/benefício.

O Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia tem atendido a Vigilância Epidemiológica e os pacientes do SUS. A maioria das amostras deste estudo foi de colo uterino e pênis, mas esperamos receber amostras da região de cabeça e pescoço com suspeita de HPV, nas quais, como descrito na literatura,¹⁵ tem apresentado abundante presença de biotina endógena, o que poderia ser um agravante na análise das amostras com sonda biotinilada.

Concluimos que a implementação dos protocolos comerciais de algumas técnicas metodológicas podem auxiliar na análise diagnóstica e contribuir na obtenção de resposta quanto à patogênese do HPV.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sonia Maria Pereira de Oliveira – Diretora do Centro de Patologia do IAL pela colaboração e incentivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *J. natl. cancer inst.* 2000; 92: 690-8.
2. Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus - induced oncogenesis. *J. virol.* 2004; 78(21):11451-60.
3. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. virol.* 2002; 76(19):10009-14.
4. Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. *J. natl. cancer inst. monogr.* 2003; 31:80-8.
5. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health.* 2015(1): 32-51.
6. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92(5):1654-8.
7. Guo M, 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.
8. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. j. biol. markers.* 2009; 24(4):215-22.
9. Steinau M, Onyekwuluje JM, Scarbrough MZ, Unger ER, Dillner J, Zhou T. Performance of commercial reverse line blot assays for human papillomavirus genotyping. *J. clin. microbiol.* 2012; 50(5):1539-44.
10. Komminoth P. Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn. mol. pathol.* 1992; 1(2):142-50.
11. Siadat-Pajouh M, Ayscue AH, Periasamy A, Herman B. 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.
12. Uhlig K, Earley A, Lamont J et al. 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 (US). AHRQ Technology Assessments; 2013.
13. Bagarelli LB, Oliani AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Rev. bras. ginecol. obstet.* 2004; 26(1):59-61. Doi:10.1590/S0100-72032004000100009
14. Montag M, Blankenstein TJ, Shabani N, Brüning 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.
15. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn. cytopathol.* 2003; 29(3):149-55.

16. Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT, Yan P. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the avidin-biotin complex system and the EnVision+ system. *Appl. immunohistochem. mol. morphol.* 2007; 15(1):103-7.
 17. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch. pathol. lab. med.* 2003; 127(8): 940-5.
 18. Unger ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. *Clin. lab. med.* 2000; 20(2):289-301.
 19. Dabić MM, Hlupić L, Babić D, Jukić S, Seiwerth S. Comparison of polimerase chain reaction and catalyzed signal amplification in situ hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch. med. res.* 2000; 35(6):511-6.
 20. Tbakhi A, Totos G, Hauser-Kronberger C et al. Fixation conditions for DNA and RNA in situ hybridization: a reassessment of molecular morphology dogma. *Am. j. pathol.* 1998; 152(1):35-4.
-
-

Correspondência/Correspondence to:

Lidia Midori Kimura
Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia – Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 7º andar – Sala 705
Pacaembu – São Paulo – SP
CEP: 01246-902