

UTILIZAÇÃO DA DUPLA EXPRESSÃO DO BIOMARCADOR Ki-67 E DO SUPRESSOR TUMORAL p16 NA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM AMOSTRAS CITOLÓGICAS CERVICOVAGINAIS

Makoto Oya Junior¹, Cleber Rafael Vieira da Costa², Michelli Aparecida Bertolazo da Silva³

Resumo

O câncer do colo do útero é a quarta neoplasia que mais mata mulheres em todo o mundo, levando a óbito milhares de mulheres todos os anos, principalmente em países subdesenvolvidos, onde essa quantidade seria muito maior não fosse a descoberta do Papanicolau, exame que tem como objetivo observar as células do colo uterino e então detectar lesões que possam ser causadas pelo HPV, responsável por todas as neoplasias que afetam o colo uterino. O HPV é considerado uma infecção sexualmente transmissível (IST), e com o avanço da medicina vários métodos de detecção do HPV, vem sendo criados com foco para os genótipos 16 e 18 considerados de alto risco e que estão presentes em 70% dos tumores do colo do útero. Entender o funcionamento do vírus e como o mesmo interage com as células do organismo a fim de se multiplicar, tem impactante importância na descoberta de técnicas que confirmem sua presença em determinada amostra. Este estudo através da literatura, buscou colher evidências para determinar a eficiência das proteínas p16 e Ki-67 duplamente marcadas em amostras citológicas HPV positivas, e assim determinar uma correlação em relação ao processo de quebra do ciclo celular e multiplicação celular que o vírus causa. Os resultados revelaram que a proteína p16 é superexpressada na presença do HPV e a proteína Ki-67 tem sua expressão diretamente relacionada a extensão da lesão. Em conclusão, as lesões de alto grau tiveram a dupla expressão de p16 e Ki-67 significativamente maior em relação as lesões de baixo grau, comprovando então a eficiência dessas proteínas em confirmar a presença do vírus, estadiamento da lesão e ainda se o HPV presente na amostra é de alto ou baixo grau podendo ser utilizadas como método de triagem.

Palavras-chave: Ciclo celular. Câncer uterino. Citologia.

Abstract

Cervical cancer is the fourth largest cancer that kills women worldwide killing thousands of women every year, especially in underdeveloped countries where that amount would be much larger if it weren't for the discovery of the Pap smear, an exam that aims to observe cervical cells and thus detect lesions that may be caused by HPV, responsible for all cancers affecting the cervix. HPV is considered a sexually transmitted infection (STI) and with the advancement of medicine several methods of HPV detection have been created, focusing on high risk genotypes 16 and 18, which are present in 70% of cervical tumors. Understand how the virus works and how it interacts with the body's cells in order to multiply, has important impact in the discovery of techniques that confirm their presence in a given sample. This study through the literature sought to gather evidence to determine the efficiency of proteins p16 and Ki-67 double-labeled in HPV positive samples, and thus determine a correlation with the cell cycle breakdown and cell multiplication process that the virus causes. The results revealed that protein p16 is overexpressed in the presence of HPV and protein Ki-67 has its expression directly related to the extent of the lesion. In conclusion high-grade lesions had significantly higher p16 and Ki-67 double expression than low-grade lesions, thus proving the efficiency of these proteins in confirming the presence of the virus, staging of the lesion and whether the HPV present in the sample is high or low grade and thus can be used as screening method.

Keywords: Cell cycle. Uterine cancer. Cytology.

1 Acadêmico do curso de Bacharelado em Biomedicina, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. mako2thai@gmail.com

2 Biólogo, aluno de Doutorado pelo departamento de medicina interna da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

3 Farmacêutica, professora Doutoranda, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR. michelli.silva@utp.br

1. Introdução

Atualmente o câncer do colo do útero, ocupa o quarto lugar em incidência entre as mulheres no mundo todo, em 2018 foram registrados cerca de 570 mil novos casos, isso representa 7,5 % de todas as mortes por essa neoplasia entre as mulheres, e a cada ano há uma estimativa de 311 mil mortes, a maioria dessas mortes ocorre em regiões menos favorecidas do mundo, representando 85% dos óbitos, em 2017 no Brasil, houve 6.385 mortes pelo câncer do colo do útero segundo o instituto nacional do câncer (INCA), esse número representa 6,2 % do total, e em 2018 foi registrado 16.370 novos casos desse tipo de câncer, representando 8,1 % do total de neoplasias (PANORAMA, 2019, ESTATISTICAS, 2019).

O câncer de colo do útero é causado pelo papiloma vírus humano (HPV) que compreende inúmeros tipos ou genótipos, dentre eles os mais comuns são 16, 18, 58, 52, e 31, destes há dois que são considerados os mais oncogênicos o 16 e o 18, as infecções atingem mais frequentemente mulheres com idade entre 25 e 45 anos, tais infecções em sua maioria regridem sem a necessidade de tratamento médico. As infecções persistentes estão associadas ao desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (KOSS, 2006, SIEGLER *et al.*, 2017, BAPTISTA *et al.*, 2019).

O HPV causa lesões clínicas e subclínicas, as lesões clínicas podem ser notadas pelo próprio paciente ou em consultório pelo médico, estas são denominadas de condilomas acuminados e são associadas aos tipos de HPV considerados não oncogênicos 6 e 11 causadores de lesões de baixo grau, já as lesões subclínicas não são visíveis e além de causar o aparecimento de condilomas acuminados, causam lesões precursoras do desenvolvimento do câncer do colo do útero, sendo associadas aos tipos de HPV oncogênicos 16 e 18, responsáveis pelas lesões de alto grau (SINAIS, 2019, QUAIS SÃO, 2019).

Existem várias formas para detectar a presença de lesões associadas a infecção pelo HPV, a mais utilizada é através do comparecimento anual ao ginecologista, onde é realizado o exame de *Papanicolaou*, para avaliação da morfologia das células da junção escamo colunar (JEC) através da citopatologia, outra forma é a prevenção através da vacinação contra os tipos de HPV mais prevalentes em lesões de baixo grau, 6 e 11 não oncogênicos, e os presentes em lesões de alto grau, 16 e 18 oncogênicos, além de exames moleculares como o *flow CHIP*, método capaz de identificar 36 tipos de HPV, compreendendo 18 de alto risco e 18 de baixo risco, o que torna o tratamento e acompanhamento de pacientes muito mais específicos (HERRAEZ *et al.*, 2013, FALCAO *et al.*, 2014).

A dupla expressão das proteínas p16 e Ki-67 também pode ser usada como um método de triagem, para a detecção do vírus HPV, pois através de suas marcações é possível garantir a presença do vírus em um determinado exame, uma vez que esses dois marcadores não se expressam juntos em situações fisiológicas (CELEWICZ *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho é descrever e avaliar através de revisão literária a utilização do supressor tumoral p16 e do marcador de proliferação celular Ki-67, duplamente expressos em exames positivos para lesões de alto e baixo grau no colo do útero para confirmar a presença dos tipos mais oncogênicos do HPV (16 e 18).

2. Metodologia

O presente trabalho é uma revisão literária sobre a infecção por HPV e a interação do supressor tumoral p16 e do marcador de proliferação celular Ki-67, onde as bases de dados consultadas foram: INCA, Ministério da saúde, Scielo, Pubmed, Goggle scholar e para selecionar os artigos e textos foram utilizados os seguintes descritores: HPV, Ki-67, p16, citologia cervico vaginal, imunocitoquímica e termos correspondentes em inglês. O período da pesquisa bibliográfica foi realizado entre julho de 2019 a dezembro de 2019, e a revisão contou com trabalhos dos últimos onze anos.

3. Discussão

3.1 HPV

O papiloma vírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae* e seu DNA de fita dupla contém inúmeras regiões, que desempenham várias funções, entre elas a região precoce (E-early) onde são produzidas as proteínas de replicação E1, E2, E6 e E7 e a região tardia (L- late) local de produção das proteínas L1 e L2 da capsula viral, as proteínas E1 e E2 são o elo de ligação do vírus com o DNA da célula invadida, após essa interação vírus-célula as regiões do controle mitótico da célula sofreram uma conexão pelas proteínas E6 e E7, que quebram esse controle do ciclo celular, ocasionando a proliferação descontrolada de células contendo material viral que deveriam ser impedidas de continuar por apresentarem defeito, a proteína L1 é hoje usada para a produção das vacinas contra o HPV (ROSA *et al.*, 2009, ALMEIDA *et al.*, 2019, ESTEVAO *et al.*, 2019).

Existem mais de 200 genótipos de HPV descobertos, e dentre estes 40 espécies afetam o ser humano, sendo classificados em HPV de alto risco oncogênico de acordo com a Agencia Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66, os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44 e 54, são considerados de baixo grau e não oncogênicos, as lesões causadas pelo HPV em sua grande maioria regredem sem necessidade de tratamento, o principal problema são infecções persistentes pelos HPVs de alto grau, mais especificamente os tipos 16 e 18, que estão presentes em 70% dos carcinomas espinocelular cervical invasivo (SCC) em todo o mundo, além disso provocam tumores em vários locais como o canal anal, a vulva, o pênis, a vagina e câncer em orofaringe, os HPVs de baixo grau 6 e 11, são responsáveis pelas verrugas genitais ou condilomas acuminados (EGAWA, DOORBAR, 2017, RIBEIRO, CAODAGLIO e SICHERO, 2018, YETE, D'SOUZA e SARANATH, 2018).

A infecção pelo HPV mais especificamente se dá através da camada basal do epitélio, pois são células que estão em constante replicação, fornecendo um cenário ideal para o HPV se replicar, a exposição da camada basal acontece durante a relação sexual que causa pequenas lesões expondo o epitélio e locais onde seu acesso é facilitado como a junção escamo colunar (SCJ) do colo uterino, região em constante replicação e transição das células glandulares para escamosas (GRAHAM, 2017, PRATI, MARANGONI e BOCCARDO, 2018).

3.2 Citologia cervicovaginal

O câncer do colo do útero é um problema mundial de saúde pública que atinge principalmente países em desenvolvimento, devido à falta de conhecimento e / ou à falta de condições financeiras, programas gratuitos de rastreamento do câncer do colo do útero através da citologia cervicovaginal são de grande valia, pois ainda existem mulheres que nunca fizeram um exame de esfregaço cervicovaginal e dados demonstram que as lesões encontradas nessa população mais carente chegou a ser 11 vezes maior, se comparado a população com melhores condições financeiras (TING *et al.*, 2017).

A participação do citologista na prevenção do câncer de colo do útero é de muita importância, pois ainda é um método de triagem muito utilizado para a detecção de lesões no colo do útero que possam vir a ser causadas pelo HPV através da visualização morfológica das células, e desde sua descoberta e utilização o número de óbitos causados por esse tipo de câncer diminuiu drasticamente, principalmente porque essas mulheres começaram a ser acompanhadas periodicamente, além do baixo custo financeiro do exame (MITTELDORF, 2016).

O sistema de classificação *Bethesda* foi criado em 1988 com o intuito de facilitar a compreensão e a nomenclatura com relação a citologia cervico vaginal, e conta com duas revisões, em 1991 o termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi substituído por lesão intraepitelial (LIE), que foi subdividido em dois grupos: lesão escamosa de baixo grau (LSIL) para NIC I e lesão escamosa de alto grau (HSIL) para NIC II e NIC III, e a segunda em 2001, que subdividiu a nomenclatura ASCUS em atípicas não neoplásicas (ASC-US), e aquelas que não se descarta lesão de alto grau (ASC-H) (BETHESDA, 1997, CARVALHO e QUEIROZ, 2010).

O exame de *Papanicolau* além de ser econômico, é eficaz na detecção precoce de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero e para determinar sua eficácia, um estudo foi realizado com amostras de *Papanicolau* e biopsia cervical e as conclusões demonstraram boa relação entre os resultados da citologia e da biopsia cervical (DHAKAL *et al.*, 2016).

3.3 Ki-67

A Ki-67 é uma proteína que está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, estando ausente somente na fase G0 e sua expressão depende de ciclinas (Cdks), em tumores malignos onde o aumento excessivo da proliferação celular é abundante, a expressão da Ki-67 aumenta na mesma proporção a tornando um excelente marcador tumoral, além disso há muitos trabalhos realizados acerca de seu valor como marcador de proliferação celular em diversos tecidos do corpo humano (LI *et al.*, 2014, SUN e KAUFMAN, 2018).

A Ki-67 pode ser usada quantitativamente na neoplasia intraepitelial cervical (NIC), ao se analisar 106 casos, com núcleos previamente marcados com Ki-67 em três camadas do epitélio e por reação em cadeia da polimerase para verificar o genótipo do HPV, os resultados demonstraram

que nas amostras que continham HPV de alto risco (NIC I, NIC II e NICIII), o número de núcleos positivos para Ki-67 por membrana basal foi maior em relação as amostras negativas para HPV e para HPV de baixo risco e a maior quantidade de núcleos marcados estavam localizados nas camadas intermediarias e superiores do epitélio, com esse resultado é possível prever infecções por HPV de alto risco, diferenciar lesões reativas de displasias e auxiliar na classificação das NICs (MIMICA *et al.*, 2010, MENDONCA *et al.*, 2012).

A fim de demonstrar a correlação entre o marcador de proliferação celular Ki-67 junto a interleucina 10 (IL-10) e a infecção pelo HPV, 110 pacientes dos quais 36 diagnosticados com câncer do colo do útero, 74 com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e 30 pacientes com cervicite crônica utilizados como controle, os resultados demonstraram que o nível de expressão de Ki-67 e a IL-10 nas amostras positivas para câncer cervical e NIC foram significativamente maiores se comparados ao grupo controle, o grupo positivo para câncer cervical, NICII e NICIII, obteve uma expressão de Ki-67 e IL-10 superior ao grupo NICI ($p < 0,05$) e ainda a expressão de Ki-67 e IL-10 obteve uma relação positiva com a infecção pelo HPV ($r = 0,783$ ou $0,712$, $p < 0,05$), isso demonstra que quanto maior é o grau de infecção pelo HPV maior é a expressão de Ki-67 e IL-10, podendo ser utilizados para rastrear a infecção pelo HPV (SOUZA *et al.*, 2011, MIN, PU e GU, 2018).

3.4 p16

A proteína p16 exerce uma das funções vitais no ciclo celular quanto a suprimir que uma célula defeituosa avance no processo de divisão, isso porque ela faz parte de uma classe de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (Cdks), a p16 suprime o avanço celular ao tomar o lugar da ciclina D no complexo ciclina D/CDK4, ao inviabilizar essa conexão a p16 paralisa o ciclo celular em G1, uma vez que a fosforilação de pRb não ocorre (QUEIROZ *et al.*, 2009, KOTAKE *et al.*, 2015).

A avaliação de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL), são de difícil diagnóstico pois podem ter inúmeros causadores além do HPV, em estudo realizado com 131 amostras de citologia líquida, das quais 86 eram ASCUS e 45 LSIL, foram submetidas a marcação imunocitoquímica pela p16 e ao teste de DNA HR-HPV (HC2) para posterior comparação, os resultados demonstraram uma especificidade e precisão de p16 superior ao do DNA HR-HPV (HC2), quanto a prever neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC) e câncer cervical, podendo assim ser utilizado para triagem de mulheres com ASCUS e LSIL (MA *et al.*, 2011, ELEUTERIO *et al.*, 2017).

O supressor tumoral p16 pode ser usado para identificar lesões de alto grau em lesões indeterminadas, em estudo realizado no Sudão o objetivo principal foi avaliar a expressão de p16 no carcinoma espinocelular (CEC) do colo uterino, ao submeter 90 amostras com câncer do colo do útero à marcação com p16, a expressão de p16 foi maior para CEC do que em outras neoplasias pelo HPV, revelando uma positividade rara uma vez que o HPV indica sua presença em displasias e não em carcinoma cervical franco e ainda positiva correlação entre p16, CEC e outras neoplasias cervicais (GONCALVES *et al.*, 2017, SARWATH *et al.*, 2017).

3.5 Dupla expressão das proteínas Ki-67 e p16

As neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), que em sua maioria são causadas pelo vírus HPV, são lesões graves que devem ser tratadas com rapidez, pois infecções persistentes tendem a não regredir levando a paciente a passar por procedimentos mais invasivos, porém há casos em que essas lesões não tem correlação com o vírus, apresentando questionamentos por parte do médico patologista, para elucidar esses questionamentos se faz uso de marcadores moleculares, quando um tecido apresenta anomalias em seu desenvolvimento ou seja displasia a proteína supressora tumoral (p16) tem uma intensa expressão e devido a essa característica se torna útil nos casos de lesões cervicais graves e nas lesões cervicais leves avaliar seu desenvolvimento, a proteína Ki-67 está expressa no ciclo celular sendo de grande valia no estadiamento da lesão (GOULART, GONCALVES e DASILVA, 2017).

A dupla expressão de Ki-67 / p16 em marcações imunocitoquímicas, se dá através do uso de anticorpos anti-p16 e anticorpos monoclonais anti-Ki-67, que conferem cor a cada proteína, a p16 que está presente no citoplasma fica marrom e a Ki-67 presente no núcleo fica vermelha, exames de pacientes femininas com idade <30 anos e entre 30 e 64, tiveram seus exames submetidos a citologia de dupla expressão de Ki-67 / p16, os resultados demonstraram que em pacientes submetidas a exames citológicos, as lesões de alto grau (ASC-H e HSIL), resultaram em uma maior expressão de Ki-67 / p16, em contrapartida as lesões de baixo grau (ASC-US e LSIL) resultaram em menor dupla expressão de Ki-67 / p16, estes resultados demonstraram que lesões de baixo grau de pacientes marcadas pela dupla expressão de Ki-67 e p16, não precisam esperar outras avaliações

indo direto ao tratamento, assim como pacientes que tiveram esta dupla expressão de Ki-67 / p16 negativa não necessitarem de exames complementares, devido a maior especificidade comparado a citologia convencional (CELEWICZ *et al.*, 2018).

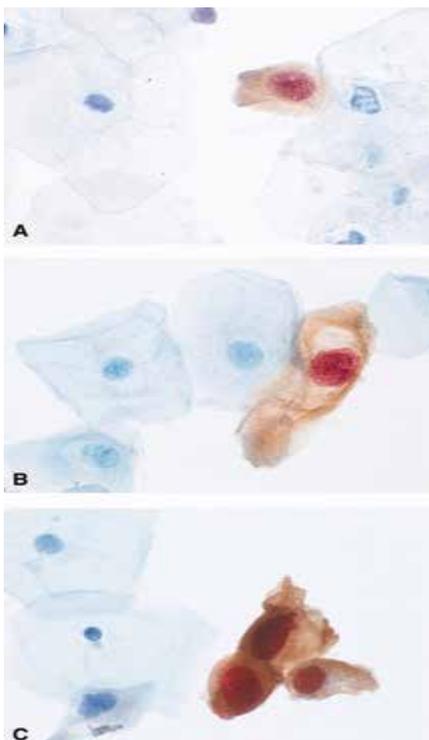


FIGURA 1. Exemplos de citologia de dupla coloração p16 / Ki-67 são mostrados para células epiteliais cervicais de dupla imuno-reatividade que caracterizam-se por um sinal citoplasmático marrom para superexpressão de p16 e um sinal nuclear vermelho para expressão de Ki-67 na mesma célula. A coloração nuclear marrom de p16 é tipicamente sobreposta em células imunorreativas duplas pelo forte sinal nuclear do corante Fast Red. A presença de pelo menos uma célula imuno-reativa p16 / Ki-67 em uma preparação de lâmina de citologia cervical define um resultado de teste positivo, independentemente da interpretação da morfologia. Resultados positivos do teste de citologia de dupla coloração p16 / Ki-67 são mostrados (aumento de 100) para células categorizadas como (A) células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), (B) lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), e (C) lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL).

FONTE: SCHMIDT *et al.*, 2011

O câncer de colo do útero é associado a infecção persistente pelo vírus HPV, e tem cada vez mais atingido mulheres em idade antes não citadas, as lesões de baixo grau (LSIL ou NICI), são lesões que tem um bom prognóstico, já as lesões de alto grau (HSIL, NICII e NICIII), tem prognóstico ruim e geralmente levam as pacientes a terem que realizar procedimentos cirúrgicos. Estudos mostram que mulheres com lesões de baixo grau, alto grau e carcinoma do colo do útero, tiveram seus exames histológicos submetidos a marcação imuno-histoquímica pelas proteínas Ki-67 / p16, e os resultados demonstraram que a intensidade da expressão combinada de ambas as proteínas foram proporcionais a extensão da lesão, esse resultado revela a grande capacidade dessas proteínas serem usadas como método de triagem, principalmente em pacientes que apresentam alto risco de desenvolver lesões de alto grau (SHI *et al.*, 2019).

O uso da genotipagem para avaliação de lesões de alto grau em infecções transitórias pelo HPV demonstrou baixa especificidade quando realizadas em mulheres abaixo dos 30 anos, em estudo realizado com 310 pacientes os resultados apresentaram que nas amostras marcadas com p16 / Ki-67, as pacientes com lesões indeterminadas (ASCUS) obtiveram resultados quanto a sensibilidade e especificidade de 66% e 93% respectivamente, assim como as lesões de baixo grau (LSIL) que foram de 59% e 79%, demonstrando uma maior especificidade dessa dupla expressão em mulheres com menos de 30 anos em comparação com a genotipagem do HPV (PIRTEA *et al.*, 2018).

Conclusão

A expressão do supressor tumoral p16 só acontece quando uma célula defeituosa tenta quebrar o ciclo de divisão, sendo acionada e impedindo a continuação do processo em G₀, o HPV de alto risco por ser muito agressivo causa uma superexpressão de p16, e essa agressividade do vírus se reflete no marcador de proliferação celular Ki-67 que novamente é superexpresso na presença o HPV de alto risco, a p16 somente se expressa em células que precisem de reparo e a Ki-67 está presente na divisão celular fisiológica, a expressão das duas proteínas ao mesmo tempo, revela que uma célula com problemas está quebrando o bloqueio e se multiplicando.

Com base no que foi apresentado, a utilização das proteínas p16 e Ki-67 duplamente expressas em amostras de lesões do colo do útero, marcadas na cor marrom para p16 presente no citoplasma e vermelha para Ki-67 presente no núcleo, não somente confirma a presença do HPV, como também se o vírus é de alto ou baixo grau pela quantidade de células marcadas, e ainda o estadiamento da lesão podendo ser utilizadas como método de triagem para o HPV, contudo mais estudos com essas proteínas e a sua relação com o HPV devem ser realizados.

Uma das áreas da biomedicina é a citologia, a citologia cervico vaginal é muito importante na área da saúde feminina, tendo seu principal foco voltado ao rastreamento do câncer do colo do útero causado pelo HPV, além disso é um exame com custo benefício excelente e essa característica faz com que possa ser de acesso a todas as mulheres, principalmente a camada menos favorecida

da população feminina que contempla a maior parte de casos de câncer do colo útero, contudo na citologia os falsos negativos ainda acontecem e a utilização de métodos como a dupla marcação das proteínas p16 e Ki-67, irá contribuir para detectar lesões pré malignas com maior antecedência.

Referências

ALMEIDA, AM; QUEIROZ, JÁ; SOUSA, F; SOUSA, Â. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. *Drug Discov Today*. Aug 6. 2019.

BAPTISTA, Aimée Denzeler; SIMAO, Carolina Xavier; SANTOS, Vitoria Carvalho Guimarães dos; MELGACO, Juliana Gil; CAVALCANTI, Silvia Maria Baeta; FONSECA, Sandra Costa; VITRAL, Claudia Lamarca. Knowledge of human papillomavirus and Pap test among Brazilian university students. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 65, n.5, p. 625-632. May. 2019.

CARVALHO, Maria Cristina de Melo Pessanha; QUEIROZ, Ana Beatriz Azevedo. Lesões precursoras do câncer cervico uterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica. *Esc. Anna Nery*, Rio de Janeiro, v.14, n. 3, p. 617-624. Sept. 2010.

CELEWICZ, A; CELEWICZ, M; WEZOWSKA, M; CHUDECKAGLAZ, A; MENKISZAK, J; URASINSKA, E. Clinical efficacy of p16/Ki-67 dual-stained cervical cytology in secondary prevention of cervical cancer. *Polish journal of pathology*, v. 69 (1):42-47. Jan. 2018.

DHAKAL, R; MAKAJU, R; SHARMA, S; BHANDARI, S; SHRESTHA, S; BASTAKOTI, R. Correlation of Cervical Pap Smear with Biopsy in the Lesion of Cervix. *Kathmandu Univ Med J(KUMJ)*, 14(55):254-257. Jul-Sept. 2016.

EGAWA, N; DOORBAR, J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res*. 231:119-127. Mar. 2017.

ELEUTERIO, Jr; JOSE, Lima; THIAGO, Silva; CUNHA, Maria do Perpétuo Socorro; CAVALCANTE, Diane Isabelle Magno; & SILVA, Angélica Maria Holanda. Immunohistochemical Expression of the Tumor Suppressor Protein p16 INK4a in Cervical Adenocarcinoma. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 21-25. jan. 2017.

ESTATÍSTICAS do câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer.23/10/2019>.

ESTEVAO, D; COSTA, NR; GIL, da Costa, RM; MEDEIROS, R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 1862(2):153-162. Feb. 2019.

FALCAO, Germana Benevides; IBIPINA, Flávio Lúcio Pontes; FEITOSA, Helvécio Neves; FEITOSA, Thiago Sant'Ana; LACERDA, Patricia Dantas de; BRAGA, José Uelers; CARVALHO, Francisco Herlânio Costa. Fatores associados à realização de citologia para prevenção de câncer do colo uterino em uma comunidade urbana de baixa renda. *Cad. saúde colet.*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 165-172. jun. 2014.

GONCALVES, Jessica E.S; ANDRADE, Cecilia Vianna de; RUSSOMANO, Fabio B; NUOVO, Gerard J; AMARO-FILHO, Sergio M; CARVALHO, Maria OO; & NICOL, Alcina Frederica. The role of p16 as putative biomarker for cervical neoplasia: A controversial issue?. *MedicalExpress (São Paulo, online)*, São Paulo, v. 4, n. 6, M170601. dez. 2017.

GOULART, Ana Paula Szezepaniak; GONCALVES, Manoel Afonso Guimarães; DA-SILVA, Vinicius Duval. Avaliação da expressão de Telomerase (hTert), Ki67 e p16 ink4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto graus. *Rev. Col. Bras. Cir.*, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 131-139. abr. 2017.

GRAHAM, SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to câncer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)*.131(17):2201-2221. Aug. 2017.



HERRAEZ, Hernandez Elisa; ALVAREZ, Perez Martina; NAVARRO, Bustos Gloria; ESQUIVIAS, Javier; ALONSO, Sonia; ANEIROS, Fernandez Jose; LACRUZ, Pelea Cesar; SANCHEZ, Aguera Magdalena; SANTAMARIA, Javier Saenz; ANTONIO, Jesus Chacon de; RODRIGUEZ, Peralto Jose Luis. HPV Direct Flow CHIP: a new human papillomavirus genotyping method based on direct PCR from crude-cell extracts. *J Virol Methods*. 193(1):9-17. Oct. 2013.

KOSS, Leopold G; GOMPEL, Claude. Introdução à Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas. 1ª Edição, Roca. 2006.

KOTAKE, Y; NAEMURA, M; MURASAKI, C; INOUE, Y; OKAMOTO, H. Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene. *Anticancer Res*. 35(8):4397-401. Aug. 2015.

KURMAN, Robert J.; SOLOMON, Diane. O sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cervico vaginal. Revinter, 1997.

LI, Lian Tao.; JIANG, Guan.; CHEN Qian.; ZHENG, Jun Nian. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*. 11, no.3, p. 1566-1572. Nov. 2014.

MA, YY; CHENG, XD; ZHOU, CY; QIU, LQ; CHEN, XD; LÜ, WG; XIE, X. Value of P16 expression in the triage of liquid-based cervical cytology with atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions. *Chin Med J (Engl)*. 124(16):2443-7. Aug. 2011.

MENDONÇA, Elisângela Barros Soares; MIRANDA, Sandrelli Virginio Vasconcelos; TELLES, Adriana Maria da Silva; ABREU-E-LIMA, Paula; & ABREU-E-LIMA, Maria do Carmo. Histomorfometria e índice proliferativo (Ki-67) no carcinoma escamocelular in situ de pregas vocais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. Rio de Janeiro, v. 48, n. 6, p. 439-446, dez. 2012.

MIMICA, M; TOMIĆ, S; KARDUM, G; HOFMAN, ID; KALITERNA, V; PEJKOVIĆ, L. Ki-67 quantitative evaluation as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Int J Gynecol Cancer*. 20(1):116-9. Jan. 2010.

MIN, Z; PU, X; GU, Z. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. *Oncol Lett*. 16(6):7189-7194. Dec. 2018.

MITTELDORF, Cristina Aparecida T. S. Cervical cancer screening: from Pap smear to future strategies. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, Rio de Janeiro, v. 52, n. 4, p. 238-245, Sept. 2016.

PANORAMA do problema. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5634:folha-informativa-hpv-e-cancer-do-colo-do-utero-&Itemid=839. 23/10/2019.

PIRTEA, Laurențiu; SECOSAN, Cristina; MARGAN, Madalin; MOLERIU, Lavinia; BALINT, Oana; GRIGORAS, Dorin; SAS Ioan; HORHAT, Florin; JIANU, Adelina; ILINA, Răzvan. p16/Ki-67 dual staining has a better accuracy than human papillomavirus (HPV) testing in women under 30 years old. *Bosn J Basic Med Sci*. Jun. 2018.

PRATI, Bruna; MARANGONI, Bruna; BOCCARDO, Enrique. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer. *Clinics*, São Paulo, v.73, supl. 1, e539s. 2018.

QUAIS SÃO os tipos de HPV que podem causar câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/hpv>. 23/10/2019.

QUEIROZ, Ana Beatriz Piazza.; FOCCHI, Gustavo Rubino de Azevedo.; GOMES, Thiago Simão.; DOBO, Cristine.; OSHIMA, Celina Tizuko Fujiyama. Estudo de p27, p21, p16 em epitélio escamoso normal, papiloma escamoso e carcinoma de células escamosas da cavidade oral. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 481-488. Dec.2009.

RIBEIRO, Aline Lopes; CAODAGLIO, Amanda Schiersner; SICHERO, Laura. Regulation of HPV transcription. *Clinics*, São Paulo, v. 73, supl. 1, e486s. 2018.

ROSA, Maria Inês da.; MEDEIROS, Lídia Rosi.; ROSA, Daniela Dornelles.; BOZZETI, Mary Clarisse.; SILVA, Fábio Rosa.; SILVA, Bruno Rosa. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 5, p. 953-964. May. 2009.

SARWATH, H; BANSAL, D; HUSAIN, NE; MOHAMED, M; SULTAN, AA; BEDRI, S. Introduction of p16 (INK4a) as a surrogate biomarker for HPV in women with invasive cervical cancer in Sudan. *Infect Agent Cancer*. 30; 12:50. Sep. 2017.

SCHMIDT, D; BERGERON, C; DENTON, KJ; RIDDER, R. European CINtec Cytology Study Group. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer Cytopathol*. 25;119(3):158-66. Jun. 2011.

SHI, Qin; XU, Ling; YANG, Rong; MENG, Yaping QIU, Lihua. Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Lett*. 18(2):1351-1355. Aug. 2019.

SINAIS E SINTOMAS. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/hpv>. 23/10/2019.

SUN, X; KAUFMAN, PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 127(2):175-186. Jun. 2018.

SOUZA, Rodrigo Tadeu de Puy e; REIS, Lorena Barcala; RAMOS, Carlos Alberto; SOUZA, Antonio Francisco de; SOUZA, Gustavo Henrique de Puy e; PEREIRA, Núbia Braga; MORO, Luciana; & VASCONCELOS, Anilton Cesar. Histomorfometria, apoptose e proliferação celular em neoplasias intraepiteliais do colo uterino. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. Rio de Janeiro, v. 47, n. 6, p. 625-634. dez. 2011.

TING, YH; TSE, HY; LAM, WC; CHAN, KS; LEUNG, TY. The pattern of cervical smear abnormalities in marginalised women in Hong Kong. *Hong Kong Med J*. 23(1):28-34. Fev. 2017.

YETE, S; D'SOUZA, W; SARANATH, D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*. 94(3):133-141. 2018.