

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Lyana Elias Santos Daud

**Detecção e genotipagem do papilomavirus humano em
amostra do colo do útero de adolescentes do Distrito
Sanitário Noroeste do município de Goiânia, Goiás**

Orientadora:

Profª Dra Maria de Fátima Costa Alves

Dissertação de Mestrado

Goiânia - GO

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Lyana Elias Santos Daud

Detecção e genotipagem do papilomavirus humano em amostra do colo do útero de adolescentes do Distrito Sanitário Noroeste do município de Goiânia, Goiás

Orientadora:

Profª Dra Maria de Fátima Costa Alves

Dissertação submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre na área de concentração de Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/ Aids – UNESCO (CFA 670/01) e com o apoio da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, Goiás.

Goiânia - GO

2005

**Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se
forem, você continuará vivendo, mas terá deixado
de existir.**

Charles Chaplin

Dedico o resultado desse trabalho a todos que amo:

A meu Deus, meu Pai, por minha existência, de onde vem toda força para construção dos meus ideais.

À minha mãezinha que construiu a base para que os meus sonhos se tornassem uma realidade. A ela devo toda esta força e luz que sempre me inspira a fundo nos meus desejos do saber... Esta luz que me orienta a seguir sempre em frente!

Ao meu marido Fabrício, que amo muito e me fortalece com seu carinho, amor e apoio. Está sempre presente fazendo com que os momentos difíceis se tornem mais fáceis.

Ao meu filho Heitor, que a partir do momento que passou a existir fez com que eu me tornasse uma pessoa muito mais feliz.

Ao meu irmão Luciano, fonte inesgotável de carinho, pelo incentivo a essa conquista. A nossa união me fortalece!

À minha vizinha Cecília, tios, tias e priminhos, por serem meus anjos e me darem sempre carinho, amor e apoio.

Ao tio Chemil, tia Jeanete, Fabiano e Lorraine, pelo imenso amor, carinho e capacidade de fazer sorrir o meu coração!

AGRADECIMENTO

À prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Costa Alves, que com a sensibilidade de uma mulher e competência de uma doutora colaborou com meu crescimento profissional e pessoal.

À prof^a. Dr^a. Eleuse Machado de Brito Guimarães, que não mediu esforço para realização e análise deste trabalho e pelas considerações oportunas.

À Dr^a. Luisa Villa, pela simpatia e participação especial na realização e interpretação dos resultados deste trabalho.

Aos colegas do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o Câncer em São Paulo, em especial Maria Cecília, João Simão, Silvaneide, José, Mônica e Stella que se tornaram amigos por me proporcionarem momentos especiais.

Aos professores Dr^a Regina Maria Bringel Martins, Dr^a Marise Amaral Rebouças Moreira e Dr^a Lucimeire Antonelli da Silveira que me ofereceram durante o exame de qualificação, muitas sugestões, exemplos e críticas fundamentais para a finalização deste trabalho.

À minha amiga e companheira Marcinha pelo empenho e dedicação nos afazeres da minha casa quando eu muito precisei da sua compreensão e ajuda.

À amiga Rejane, pelo carinho e companheirismo que me acompanhou em todos os momentos.

Às minhas amigas Lorena e Raquel, minhas fiéis ouvintes, que me ajudaram muito com os seus carinhos, preocupações e sabedorias.

Aos bolsistas Lorena, Tiago e Antônio, que auxiliaram na parte técnica e tornaram grandes amigos.

Às colegas Mônica, Miriam e Marise, pelo esclarecimento de informações científicas.

Aos professores de IPTSP em nome da prof^a. Dr^a. Regina Maria Bringel Martins, coordenadora do mestrado em medicina tropical pelo excelente curso oferecido e pelas sugestões na descrição deste trabalho.

Não posso deixar esquecidas as pessoas que contribuíram de uma maneira ou de outra, para a minha realização como pessoa e amiga. Sr. Fernando, Cida, Divininha, Zezinho, Karine e outros, a vocês também dedico o meu trabalho.

À equipe do projeto “Adolescer com Saúde” que trabalhou com muito carinho e dedicação para a realização deste projeto.

À equipe do PSF e às adolescentes da Região Noroeste pela participação essencial nesta pesquisa.

À UNESCO e à Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, pelo apoio financeiro concedido nesta pesquisa.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo papilomavirus humano (HPV) é um fator causal necessário para o desenvolvimento do câncer cervical. Dos vários tipos de HPV conhecidos alguns são considerados como de alto risco oncogênico pela sua associação com lesões cervicais pré-neoplásicas e câncer cervical. A infecção genital pelo HPV é altamente prevalente em mulheres jovens sexualmente ativas. Atualmente o sistema de *primers* de consenso PGMY09/11 associado à análise de polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP), à hibridização ou ao seqüenciamento é um dos métodos mais sensíveis para detecção e tipagem do DNA-HPV em amostras genitais.

Objetivos: Detectar o DNA-HPV e identificar os genótipos virais em amostras endocervicais de adolescentes sexualmente ativas do distrito sanitário noroeste do município de Goiânia.

Metodologia: Realizou-se um estudo transversal com 432 adolescentes residentes no distrito sanitário noroeste do município de Goiânia e atendidas pelo programa de saúde da família. A detecção do DNA-HPV foi realizada em amostras endocervicais através da PCR empregando os *primers* de consenso PGMY09/11. A presença de DNA amplificável foi avaliada com os *primers* da β -globina (PCO3/PCO4). A identificação genotípica do HPV foi feita a partir do produto da PCR através de hibridização reversa *line blot* e RFLP.

Resultados: O DNA-HPV foi detectado em 121 amostras, o que correspondeu a uma prevalência de 28% (IC95% 23,8-32,5). Todas as 432 amostras foram amplificadas com os *primers* da β -globina (PCO3/PCO4), confirmando a adequação do DNA. Foram identificados 30 genótipos diferentes de HPV sendo os mais prevalentes os de alto risco oncogênico: HPV-16 (6,7%), HPV-51 (5,1%), HPV-31 (4,6%), HPV-52 (4,2%) e HPV-18 (3,5%). A hibridização *line blot* possibilitou a identificação de 54 casos de infecções múltiplas, nos quais os HPVs 16, 51, 18, 53 e 52 foram os mais freqüentes.

Conclusão: A prevalência do DNA-HPV foi elevada e identificou-se um amplo espectro de genótipos do HPV, predominando os de alto risco oncogênico. A freqüência de infecções múltiplas foi alta na população estudada.

Palavras-chave: Papilomavirus humano; PCR-PGMY09/11; RFLP; hibridização *line blot*; adolescentes.

ABSTRACT

Background: Human Papillomavirus (HPV) infection is a strong predictor for cervical cancer development. Some HPV types are considered at high-risk and associated with pre-malignant lesions and cervical cancer. Genital HPV infection is highly prevalent in sexually active young women. Actually PGMY09/11 primer system associated with Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), hibridization or DNA sequencing is one of the most sensitive methods for detecting and typing HPV-DNA in genital samples.

Objectives: To detect and identify HPV-DNA genotypes in genital specimens among sexually active female adolescents from Distrito Sanitário Noroeste, Goiânia.

Methods: We performed a cross-sectional study among 432 sexually active female adolescents (15-19 years), randomly selected at Distrito Sanitário Noroeste, Goiânia, and served by the Family Health Program. HPV-DNA was detected by PCR assay, in endocervical samples, using the PGMY09/11 consensus primer set. The presence of amplifiable DNA was assessed with β -globin primers (PCO3/PCO4). Amplicons generated with PGMY primers were typed with the line blot assay (PGMY-*line blot*) and RFLP.

Results: HPV-DNA was detected in 121 samples yielding a 28% prevalence (95% CI 23.8-32.5). All samples yielded a β -globin amplimer, confirming the DNA adequacy. Thirty different HPV genotypes were identified, the high risk genotypes frequently found being: HPV-16 (6,7%); followed by HPV-51 (5,1%); HPV-31 (4,6%); HPV-52 (4,2%) and HPV-18 (3,5%). PGMY-line blot test identified 54 cases of infection caused by multiple genotypes. The genotypes 16, 51, 18, 53 and 52 were the most frequently associated with cervical co-infection with multiple HPV types.

Conclusions: A high prevalence of HPV-DNA was found and a broad spectrum of HPV genotypes was identified, predominantly high risk HPV genotypes. A high frequency of multiple HPV infections was found in the studied population

Keywords: Human Papillomavirus; PGMY09/11-PCR; RFLP; *line blot* hybridization; adolescents.

LISTA DE ABREVIATURAS

BPV	- papilomavirus bovino
DST	- doença sexualmente transmissível
FDA	- Food and Drug Administration
HC	- captura híbrida
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
HPV	- papilomavirus humano
HSP	- estreptavidina - peroxidase
IARC	- International Agency for Research on Câncer
IBSCC	- International Biological Study on Cervical Câncer
IC	- intervalo de confiança
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
IPTSP	- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LCR	- região longa de controle
MS	- Ministério da Saúde
NIC	- neoplasia intraepitelial cervical
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ORF	- região de leitura aberta
Pb	- pares de bases
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PNI	- positivo não identificado
PSF	- programa saúde da família
Rb	- Retinoblastoma
RFLP	- análise do polimorfismo dos fragmentos por enzimas de restrição
t.a.	- temperatura ambiente
TE	- TRIS - EDTA
TMB	- tetrametilbenzidina
UFG	- Universidade Federal de Goiás
WHO	- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1: Morfologia do papilomavirus humano (HPV)	14
Figura 2: Mapa físico do genoma episomal do HPV-16	15
Figura 3: Representação esquemática da localização dos diferentes <i>primers</i> (PGMY09/PGMY11, MY09/MY11, GP5+/GP6+) no genoma do HPV.	25
Figura 4: Representação esquemática da genotipagem do HPV em produto de PCR pelo método de hibridização reversa <i>line blot</i>	36
Figura 5: Esquema de sondas na tira de genotipagem do HPV	37
Figura 6: Produtos da PCR empregando os primers PGMY09/11.	41
Figura 7: Identificação genotípica do HPV16 (amostra 349) utilizando a técnica de RFLP.	42
Figura 8: Identificação genotípica do HPV através de hibridização <i>line blot</i>	43
Quadro 1: <i>Primers</i> PGMY empregados na PCR	33
Quadro 2: Programa para amplificação do DNA.....	34
Tabela 1: Características sócio-demográficas das adolescentes sexualmente ativas do Distrito Sanitário Noroeste do Município de Goiânia, GO, 2003.	40
Tabela 2: Prevalência genotípica do HPV determinada através da RFLP e hibridização <i>line blot</i>	44
Tabela 3: Freqüência dos genótipos do HPV em infecções únicas e múltiplas	45
Tabela 4: Ocorrência de infecções múltiplas de acordo com os tipos de HPV	46

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Aspectos gerais.....	12
1.2 A biologia do HPV	14
1.3 A infecção pelo HPV.....	19
1.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HPV.....	21
1.5 Identificação genotípica do HPV	26
1.6 Justificativa	27
2. OBJETIVOS	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1 Obtenção e processamento das amostras.....	31
3.2 Extração do DNA	31
3.3 Precipitação e Purificação do DNA.....	32
3.4 Detecção do DNA-HPV utilizando-se a PCR.....	32
3.5 Identificação genotípica do HPV por RFLP	34
3.6 Identificação genotípica do HPV através de hibridização reversa (<i>line blot</i>).....	35
3.7 Processamento e análise dos dados.....	38
3.8 Considerações éticas	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Características sócio-demográficos da população estudada	39
4.2 Detecção do DNA-HPV	40
4.3 Genotipagem do HPV	41
5. DISCUSSÃO	48

CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	69
Anexo 1: Questionário 1	
Anexo 2: Mapas de restrição dos diferentes tipos de HPV	
Anexo 3: Termo de consentimento informado nº 1	
Anexo 4: Termo de consentimento informado nº 2	
Anexo 5: Parecer do Comitê de Ética	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

O câncer de colo uterino é uma das mais comuns neoplasias em mulheres; em uma perspectiva mundial, ocupa o segundo lugar, perdendo apenas para o câncer de mama, tanto em incidência quanto em mortalidade (Koutsky 1997, Walboormers *et al.* 1999, Bosch *et al.* 2002). Segundo a IARC (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*), e a Organização Mundial de Saúde (OMS), o índice mundial do câncer cervical é de 2.274.000, com 1.300.000 casos na Ásia, 337.000 na Europa, 218.000 na África, 172.000 na América Latina, 167.000 na América do Norte e 80.000 na Austrália (WHO 2004). De acordo com o Ministério da Saúde (MS), o câncer de colo do útero foi responsável pela morte de 3.953 mulheres no Brasil em 2000, e as estimativas de novos casos de câncer cervical para 2003 são de 18,32/100.000 habitantes, com um número de óbitos estimado de 4,58/100.000 habitantes. Em Goiás, no entanto, essas estimativas chegam a 33,06/100.000 e 5,24/100.000 habitantes, respectivamente, superando inclusive, o câncer de mama (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2004).

Atualmente, não há mais dúvida que o papilomavirus humano (HPV, do inglês, *Human papillomavirus*) é o agente causal necessário para o desenvolvimento do câncer cervical (IARC 1995, Walboormers & Meijer 1997), com uma prevalência mundial de 99,7% do DNA HPV em carcinomas cervicais (Villa 1997, Walboormers *et al.* 1999, Bosch *et al.* 2002, Zur Hausen 2002, Sherman & Lorincz 2003). O vírus é um fator necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença, necessitando da atuação de co-fatores (Munoz 2000, Almeida & Val 2002).

A infecção genital pelo HPV é a doença viral sexualmente transmissível (DST) mais freqüente na população de adolescentes sexualmente ativas ocorrendo

primariamente através do contato sexual com os epitélios cervical, vaginal, vulvar, peniano ou anal infectados (Moscicki 1999).

Embora as conseqüências graves da infecção pelo HPV em geral, só sejam observadas décadas mais tarde, os índices de detecção do HPV em mulheres jovens são de 2 a 3 vezes maiores que nas mulheres adultas (Lappa *et al* 1999, Crum 2000, Ludicke *et al.* 2001, Nonnemacher *et al.* 2002). Esse fato deve-se a fatores biológicos e psicossociais. Com relação aos primeiros, refere-se à extensão do epitélio colunar à ectocérvice (ectopia), sendo este epitélio mais suscetível às infecções que o epitélio escamoso não só em relação ao HPV como também a outros patógenos como a *Neisseria gonorrhoeae* e a *Chlamydia trachomatis* (Gewelber & Biro 1999). Quanto aos aspectos psicossociais, deve-se lembrar que a adolescência é uma fase crítica da vida humana na qual muitas vezes aparecem comportamentos de risco. Entre eles, destacam-se, na atualidade, a iniciação sexual precoce, a multiplicidade de parceiros sexuais, o uso inconsistente de preservativos, o uso e o abuso de álcool e de outras drogas ilegais e o tabagismo (Ley *et al.* 1991, Ho *et al.* 1998, Richart *et al.* 1998, Moscicki *et al.* 2000, Moscick *et al.* 2001, Schiffman & Castle 2003).

Na infecção cervical pelo HPV podem estar presentes múltiplos genótipos do HPV. As co-infecções são detectadas principalmente em mulheres jovens, e isso se deve ao fato delas terem sido pouco expostas aos vírus e, conseqüentemente, não apresentarem uma resposta imune eficiente contra o HPV, o que explica a grande incidência de infecções múltiplas nessas jovens quando comparadas com mulheres adultas (Fife *et al.* 2001, Molano *et al.* 2002, Rousseau *et al.* 2003a). A presença de múltiplos tipos de HPV em amostra cervical pode estar associada com risco aumentado de desenvolver neoplasia cervical quando comparada com infecções por um único tipo de HPV (van der Graaf *et al.* 2002).

1.2 A biologia do HPV

Os papilomavirus humanos fazem parte do gênero *Papillomavirus*, da família *Papilomaviridae*. As partículas virais são estruturas icosaédricas de aproximadamente 54 nm de diâmetro (Figura 1) (Doobar & Sterling 2001, de Villiers *et al.* 2004).

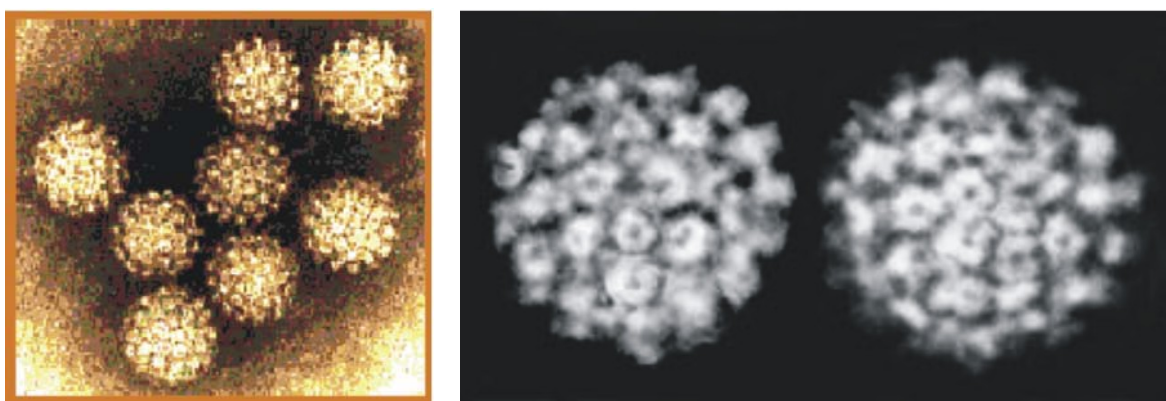


Figura 1: Morfologia do papilomavirus humano (HPV).

Fonte: www.hpv.ru/venera/dis/papiloma.htm; www.cdcnpin.org/scripts/std/std.asp.

Existem atualmente, já identificados com base na homologia do DNA, mais de 100 tipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 são encontrados no trato genital (Bosch *et al.* 1995, Richardson *et al.* 1999). Um genótipo do HPV é definido como um novo tipo quando o seu DNA tem menos de 90% de similaridade nucleotídica com outro genótipo de HPV já descrito. Um novo subtipo é definido quando tem uma similaridade nucleotídica entre 90 a 98%; uma variante de HPV é definida quando tem mais de 98% de similaridade nucleotídica com um HPV já descrito (Barrasso 2000). Os HPVs genitais podem ser divididos em dois grupos de acordo com a frequência de associação com carcinomas cervicais. Os de baixo risco oncogênico incluem os HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 62, 72, 81, 83, 84 e 89 (Bernard *et al.* 1994, Richardson *et al.* 1999, Munoz 2000, Munoz *et al.* 2003, Rousseau *et al.* 2003b, de Villiers *et al.* 2004). Já os de alto risco oncogênico são os HPVs 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82 (Gravitt *et al.* 2000, Munoz *et al.* 2003, de Villiers *et al.* 2004). O HPV 16 é o

mais prevalente no mundo e está presente em cerca de 50% dos casos de câncer invasor do colo uterino (Almeida & Val 2002, Sherman & Lorincz 2003).

O genoma dos papilomavirus é constituído de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000 pares de bases (pb), contendo 10 regiões de leitura aberta (do inglês, *Open Reading Frames* - ORFs) (Turek & Smith 1997). O genoma viral pode ser dividido em três regiões: região reguladora que é uma longa região de controle (do inglês, *Long Control Region* - LCR) cobrindo cerca de 10% do genoma; uma região precoce (do inglês, *Early* - E) e uma região tardia (do inglês, *Late* - L) (Figura 2). A estrutura do genoma apresenta uma acentuada semelhança entre os diferentes vírus deste grupo: a localização das ORFs apresenta um alto grau de correspondência e somente uma fita é ativa transcricionalmente conseqüentemente a transcrição só ocorre em uma direção (Zur Hausen 1996). O mapa genômico do HPV-16 pode ser considerado como protótipo de todos os genótipos do HPV (Hubbard 2003).

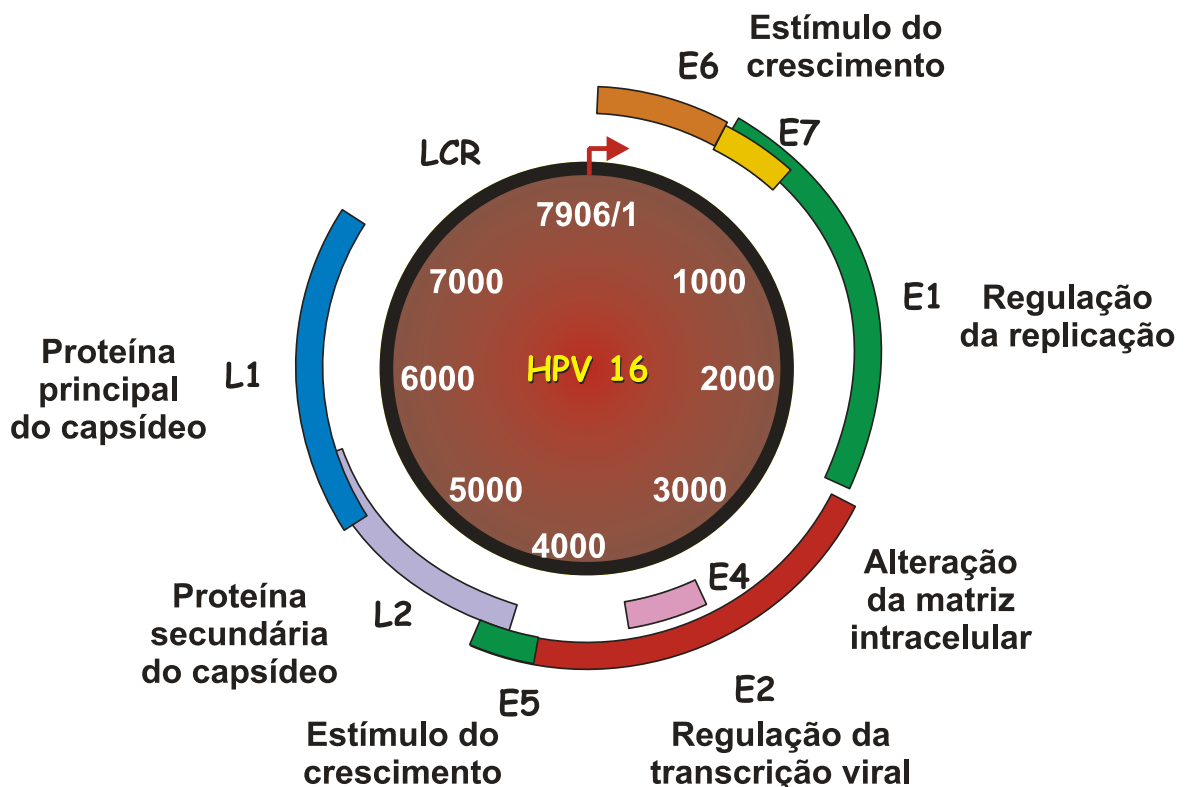


Figura 2: Mapa físico do genoma episossomal do HPV-16 (Revisado por Villa, 1997).

A região tardia (L) participa da expressão de proteínas estruturais do capsídeo viral, a região precoce (E) codifica proteínas associadas à replicação e à transformação, ou seja, é responsável pela oncogenicidade e a região reguladora (LCR) regula a transcrição das proteínas da região precoce (Zur Hausen 1996).

Estruturalmente, a região precoce ou inicial é constituída por ORFs conhecidas como E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os papilomavirus humanos não possuem os genes E3 e E8, presentes no papilomavirus bovino (BPV), cuja função não é conhecida até o momento (Doobar & Sterling 2001). A transcrição de E6 e E7 produz oncoproteínas que podem promover a transformação neoplásica da célula hospedeira (Broker 1987, Zur Hausen 1996).

Proteína E1:

A replicação do genoma dos papilomavirus é controlada pela proteína codificada pelo gene E1. A proteína E1 tem sítios específicos de ligação ao DNA, sendo essencial para a replicação viral. A ORF E1 representa a estrutura mais conservada entre os diferentes tipos de papilomavirus (Zur Hausen 1996).

Proteína E2:

A ORF E2 codifica pelo menos duas, provavelmente três, diferentes proteínas, todas atuando como fatores de transcrição, que afetam diferentemente a expressão dos genes virais e são os principais reguladores intragenômicos (Zur Hausen 1996). O genoma viral é frequentemente integrado ao da célula hospedeira nas lesões cervicais malignas. A integração cromossômica frequentemente resulta na ruptura da ORF E2 (Sanches-Perez *et al.* 1997). Argumenta-se que a ruptura do gene E2 poderia levar a desregulação do ciclo celular e da via de diferenciação celular e, finalmente, ao fenótipo transformado. A deleção da ORF E2 é frequentemente observada em biópsias de câncer cervical e em linhagens celulares derivadas deste câncer (Zur Hausen 1996). Acredita-se que a perda de E2 aumente os níveis de E6 e E7, cujas expressões contínuas são necessárias para a manutenção do estado transformado das células (Desaints *et al.* 1997).

Proteína E4:

A proteína E4 parece ser incorretamente considerada como um produto do gene precoce. O papel dessa proteína no ciclo de vida viral ainda não está bem determinado, acreditando-se que a sua síntese esteja ligada à diferenciação terminal dos queratinócitos. Ela não é necessária para a transformação ou persistência episomal do DNA viral. A proteína E4 está exclusivamente localizada nas camadas diferenciadas do epitélio infectado e a sua interação com as citoqueratinas resulta, para alguns autores, na formação dos coilócitos (Zur Hausen 1996, Turek & Smith 1997).

Proteína E5:

A proteína E5 é a principal proteína transformante do papilomavirus bovino (BPV). Em contraste, a E5 do HPV tem somente uma pequena atividade transformante. A ORF codificante para E5 é freqüentemente deletada em cânceres cervicais. Este fato apoia a hipótese de que E5 desempenha um papel nos passos iniciais da infecção por HPV, mas é obviamente dispensável para a manutenção da transformação maligna (Zur Hausen 1996). A proteína E5 parece não ter participação na oncogênese humana, uma vez que não é expressa nos tumores. Apesar disso, as ações dessa proteína na célula podem ser fundamentais na preparação para a transformação celular, quando então, as funções das proteínas E6 e E7 tornam-se mais importantes (Mc Glennen 2000).

Proteínas E6 e E7:

Os genes E6 e E7 dos HPVs codificam as proteínas E6 e E7, respectivamente. Essas proteínas nos HPVs de alto risco estão diretamente envolvidas com a transformação celular (Howley 1989, Borysiewicz *et al.* 1996).

A atividade oncogênica da proteína E6 tem sido verificada em muitos ensaios biológicos. Essas incluem imortalização de células primárias, transformação de linhagens celulares, resistência à diferenciação terminal, tumorigênese e alteração dos estágios do ciclo celular (Rapp & Chen 1998).

A evolução de uma célula normal para a malignidade está associada com

alterações genéticas envolvendo a ativação de vários oncogenes e perda de genes supressores tumorais. As oncoproteínas codificadas por pequenos vírus DNA são proteínas multifuncionais. Elas usualmente não possuem atividade enzimática intrínseca, mas, atuam preferencialmente alterando a atividade de proteínas celulares envolvidas na proliferação. As proteínas E6 e E7 dos HPVs são algumas dessas oncoproteínas (Munger *et al.* 1989, Rapp & Chen 1998).

A oncoproteína E6 tem a capacidade de ligar-se à proteína p53, que é um ativador transcricional dos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, degradando-a e assim desempenhando ação anti-apoptótica (Finzer *et al.* 2002). A habilidade da proteína E6 de HPVs de alto risco de inativar a p53 (proteína supressora tumoral) foi sugerida como mecanismo pelo qual a proteína viral promove o crescimento e a proliferação celular (Turek & Smith 1997, Rapp & Chen 1998, Poliseno *et al.* 2002).

A proteína E7 pode ligar-se à proteína do retinoblastoma, inativando-a e liberando E2F, um ativador de promotores de genes que codificam sinais positivos de crescimento celular, o resultado é a ação estimuladora dos produtos desses genes sobre a progressão do ciclo celular (Gonzales *et al.* 2001).

As oncoproteínas E6 e E7 derivadas dos HPVs de alto e baixo risco oncogênico ligam-se ao Rb (retinoblastoma) e ao p53 com elevada e baixa afinidades, respectivamente. O maior potencial oncogênico dos HPVs de alto risco comparado aos HPVs de baixo risco pode estar relacionado a essa diferença de afinidade (Richart *et al.* 1998).

Proteínas L1 e L2:

Os genes tardios L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral. A proteína L1 é o constituinte predominante do capsídeo, sendo altamente conservada em todos os tipos de HPVs. A proteína L2, ao contrário, é altamente variável, característica importante para as diferenças na antigenicidade dos HPVs (Richart *et al.* 1998).

A região longa de controle (LCR) não é codificante e contém seqüências de

controle para a regulação e expressão gênica dos HPVs (Turek & Smith 1997). Essa regulação é complexa, sendo controlada por fatores de transcrição celulares e virais, que na maioria das vezes tem a participação da LCR, que varia substancialmente em sua composição nucleotídica entre os tipos de HPVs. A LCR dos HPVs ano-genitais variam de tamanho, apresentando de 800 a 900 pb (Zur Hausen 1996).

1.3 A infecção pelo HPV

O HPV é um organismo obrigatoriamente intracelular que precisa infectar células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Este fato provavelmente explica porque tanto o carcinoma escamoso, quanto o glandular, da cérvix começam inicialmente na junção escamocolumnar e na zona imatura de transformação (Richart *et al.* 1998). A infecção pelo HPV no trato genital inferior é dividida em (Naud *et al.* 2000):

- Infecção clínica: é a forma clinicamente evidenciável, ou seja, por observação a olho nu dos condilomas acuminados, vulgarmente denominados de “crista de galo”.
- Infecção subclínica: é a forma evidenciável através do exame citológico e da colposcopia, após aplicação prolongada de ácido acético a 5%, e também através de técnicas de biologia molecular. A infecção subclínica difere da infecção clínica apenas em nível macroscópico.
- Infecção latente: é a forma evidenciável apenas através de técnicas de biologia molecular em indivíduos com citologia e histologia normal. (Richart *et al.* 1998, Naud *et al.* 2000)

Quando o vírus infecta uma célula epitelial mitoticamente ativa, pode resultar numa infecção latente, na qual o DNA na sua forma episomal (circular) despido reside no núcleo e a replicação viral está vinculada com o ciclo celular. Células infectadas latentemente pelo HPV parecem ser morfológicamente normais e o vírus parece não interferir na divisão celular. Uma infecção latente pode ser convertida para uma infecção clínica ou subclínica, mas o sinal iniciador desta conversão não é conhecido. Está claro, contudo, que indivíduos imunossuprimidos

fisiologicamente (como na gravidez) ou patologicamente (como infectados pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV) têm risco substancialmente aumentado de apresentar infecções replicativas pelo HPV, sendo que, quando este estado de imunossupressão acaba, o vírus pode novamente se tornar latente, como é comumente visto no pós-parto (Wright 1995).

Estudos epidemiológicos em ampla escala mostram que a forma mais freqüente de infecção pelo HPV é a latente, podendo atingir até 40% de positividade em adolescentes sexualmente ativas. Essas adolescentes não apresentam nenhuma alteração macroscópica e a detecção do HPV é feita através de técnicas de biologia molecular. Apesar da alta incidência tanto de HPV de alto como de baixo risco, a infecção por esse vírus é predominantemente transitória e não evolui para lesões. Por outro lado, a persistência da infecção pelo HPV de alto risco, bem como carga viral elevada, estão associadas ao desenvolvimento de lesões e à progressão da doença (Richart *et al.* 1998, Dalstein & Reithmuller 2003).

A maioria das infecções iniciais pelo HPV no epitélio da cérvix parece desaparecer espontaneamente sem tratamento, provavelmente devido a resposta imune do hospedeiro. Todavia não se pode prever, em indivíduos com imunidade adequada, que tipo de infecção viral persistirá e qual se tornará latente ou progredirá para neoplasia intraepitelial escamosa (NIC) ou câncer invasivo.

Embora já não haja dúvida de que a infecção pelo HPV seja o fator necessário para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, ele não é suficiente. Existem três grupos de co-fatores relacionados com a progressão para lesão de alto grau e câncer invasor: fatores relacionados ao vírus, o tipo e a carga viral, fatores relacionados ao hospedeiro, a idade, o estado nutricional, as condições sócio-econômicas, as condições imunes, a paridade e possivelmente fatores genéticos, além de fatores comportamentais, tais como a idade da primeira relação sexual, o número de parceiros sexuais e o uso de cigarro (Schiffman & Brinton 1995, Ho *et al.* 1998, Moscicki *et al.* 1998, Richart *et al.* 1998, Bosch *et al.* 2002, Frega & Stentella 2003, Schiffman & Castle 2003, Tarkowski *et al.* 2004). Outros possíveis co-fatores, citados na literatura, são o uso de contraceptivos hormonais, deficiência de folatos e vitamina C, além da co-infecção por herpes e/ou clamídia (de Sanjose & Munoz 1994).

1.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HPV

A grande importância de se diagnosticar a infecção pelo HPV decorre de seu papel, hoje conhecido, como agente etiológico do câncer cervical. Os principais métodos laboratoriais disponíveis são: a citologia, a histopatologia e os métodos de biologia molecular. A imunohistoquímica e a sorologia têm pouca aplicação na prática clínica atualmente (Cho *et al.* 1998, Hubbard 2003).

A **citologia vaginal (Papanicolaou)** é um dos recursos mais importantes já disponibilizados em medicina preventiva. Esse método permite, além do diagnóstico de câncer, a observação do efeito citopático do HPV (coilocitose) e, ainda, o que é mais importante, das transformações celulares pré-neoplásicas causadas pelos HPVs oncogênicos. Como o HPV é encontrado em praticamente todos os casos de carcinoma ou de lesões pré-neoplásicas, um diagnóstico citológico de carcinoma ou de lesão intra-epitelial significa, também, um diagnóstico de infecção pelo HPV. É um método simples e de baixo custo, porém, de baixa sensibilidade e especificidade (Cuzick *et al.* 2000, Almeida & Val 2002, Cuzick 2002).

A **colposcopia** apresenta a vantagem da informação imediata da presença ou ausência de lesão significativa e da sua avaliação topográfica e devido à sua elevada sensibilidade, permite indicar a melhor forma de tratamento (Mitchell *et al.* 1999, Wright *et al.* 2002). As desvantagens incluem, custo às vezes elevado, o potencial para exageros no diagnóstico e tratamento devido à elevada sensibilidade e à baixa especificidade, e às vezes a espera de uma a duas semanas pelo resultado histopatológico (Wright *et al.* 2002).

A **histopatologia** é um método que permite um diagnóstico preciso das lesões pré-neoplásicas. Existem, entretanto, lesões de difícil interpretação, principalmente aquelas que exibem alterações discretas, ou que se apresentam associadas à atrofia ou à regeneração epitelial (Jovanovic *et al.* 1995).

A fim de se proceder a confirmação do diagnóstico, bem como a determinação do tipo do HPV causador da infecção, somente as técnicas

moleculares que permitem a análise do genoma viral têm se mostrado eficientes. Existem vários métodos de biologia molecular para a detecção e a quantificação do HPV, como hibridização *Southern* e *dot blot* com sondas específicas para o tipo de HPV (Jacobs *et al.* 1995), Captura de híbridos (Venturoli *et al.* 2002), PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*) com *primers* tipo-específico (Baay *et al.* 1996) e PCR com *primers* de consenso (de Roda Husman *et al.* 1995).

A detecção molecular inicial do DNA-HPV foi efetuada pelo uso de técnicas de hibridização molecular, southern blot (Hubbard 2003). Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção de DNA-HPV, devido ao seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV quando utiliza-se enzimas de restrição. A desvantagem desse método é o fato de ser caro e trabalhoso e de requerer quantidades relativamente grandes de tecido que precisa ser congelado imediatamente após a excisão do espécime. As técnicas simplificadas e automatizadas de hibridização, como dot-blot, são mais rápidas e fáceis, mas apresentam uma especificidade menor (Reid & Lorincz 1995).

A **hibridização *in situ*** permite a localização do ácido nucléico viral dentro das células. Da mesma forma que os outros métodos, baseia-se no pareamento complementar de sondas específicas com o DNA viral presente no espécime clínico. As sondas moleculares (“probes”) são previamente marcadas com substâncias como biotina ou digoxigenina, podendo utilizar-se também material radioativo (P^{32} , S^{35} , H^3), se necessário. A principal vantagem é a possibilidade de não somente identificar o tipo viral e a sua localização nas áreas infectadas, mas principalmente o estado físico do DNA, se episossomal ou incorporado ao genoma da célula hospedeira. É crescente o número de autores que utilizam essa técnica com resultados e conclusões importantes, principalmente no que tange à presença de partículas virais incorporadas ao genoma e ao seu papel prognóstico. Entretanto, a sensibilidade do método é prejudicada, pois o DNA do espécime está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula, ao invés de encontrar-se isolado e concentrado (Hubbard 2003).

A **Captura de híbridos** é uma técnica molecular extremamente específica e de fácil execução que fornece a tipagem viral por grupos (alto e baixo risco), além de permitir uma estimativa da carga viral em determinada amostra.

Sondas de RNA complementares a áreas específicas do genoma da maioria dos tipos virais são utilizadas. Caso existam partículas virais no espécime clínico, os híbridos formados entre o DNA viral e as sondas específicas são capturados na parede do tubo de reação ou microplaca recobertas com anticorpos específicos marcados com fosfatase alcalina. As sondas não reagentes são lavadas e a detecção da reação é feita pela adição de substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina. A consequente emissão de luz é lida por luminômetro, sendo a intensidade da luz proporcional à quantidade de HPV na amostra (Lin *et al.* 2000, Sun *et al.* 2002). A captura de híbridos é realizada rotineiramente em material colhido por escova e biópsia não incluídas em parafina. A vantagem da técnica é a alta sensibilidade e especificidade, porém tem custo elevado e não determina o tipo específico do HPV presente na amostra (Cuzick 2002, Hubbard 2003). A inclusão dos testes de detecção de DNA-HPV em rastreamentos de rotina, especificamente a captura de híbridos de 2ª geração (HCII do inglês, Hybrid Capture), foi recentemente aprovada pelo FDA americano (do inglês, *Food and Drug Administration*) como complemento do Papanicolaou para detecção de lesões precursoras do câncer cervical (Petry *et al.* 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) tem sido usada para a detecção de HPV, genotipagem e determinação da carga viral (Hubbard 2003). Com a PCR, segmentos específicos de DNA podem ser amplificados até um milhão de vezes em questão de horas, transformando minúsculas quantidades de DNA-HPV em quantidades facilmente detectáveis (Manos *et al.* 1989). O DNA a ser estudado pode ser coletado por escova endocervical, lavado vaginal, fragmento de biópsia, fresco ou bloqueado em parafina. Nessa técnica, utiliza-se a enzima Taq DNA polimerase que é capaz de sintetizar DNA a partir de apenas uma cópia dessa molécula, através da incubação sucessiva e repetida a temperaturas que causem desnaturação do DNA molde, pareamento com oligonucleotídeos específicos e síntese de DNA.

Os métodos baseados em PCR utilizam conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) de consenso ou genéricos, ou *primers* específicos para um determinado tipo viral que permite a amplificação do DNA-HPV desejado, mesmo que presente em quantidades ínfimas (Remmerbach *et al.* 2004).

A PCR utilizando os *primers* tipo-específico requer a realização de múltiplas reações de PCR, enquanto que os *primers* de consenso foram desenvolvidos para detectar um amplo espectro de genótipos de HPV a partir de uma única reação de PCR (Kleter *et al.* 1999, Chow *et al.* 2000, Coutlée *et al.* 2002).

Os chamados “*primers degenerados*” (do inglês, “*degenerate primers*”) possibilitam, em um único tubo, a pesquisa de vários tipos virais simultaneamente. Nessa eventualidade, existe ainda a necessidade de estudo complementar com enzimas de restrição para determinar com exatidão o(s) tipo(s) virais (Bernard *et al.* 1994). Seqüências iniciadoras genéricas ganharam reconhecimento internacional, por amplificar regiões conservadas do genoma viral, correspondendo à região L1.

Várias seqüências de primers de consenso têm sido utilizadas. Os *primers*, GP5+/GP6+, SPF10, MY09/MY11 e PGMY09/11 possuem diferentes características que permitem detectar e genotipar um amplo espectro de tipos de HPV (Hildesheim *et al.* 1994, Jacobs *et al.* 1997, Hubbard 2003).

Existem cerca de 40 tipos já identificados de HPVs no trato genital, que geralmente são detectados em amostras clínicas pelos métodos de PCR com *primers* de consenso. Os dois sistemas comumente usados MY09/11 e GP5+/6+ amplificam seqüências alvo no gene L1 do HPV de um amplo espectro de genótipos, porém com diferentes níveis de sensibilidade entre os tipos de HPV. Estes testes têm sido utilizados nos estudos sobre a história natural da infecção pelo HPV (Snijders *et al.* 1990, Bauer *et al.* 1991, Tieben *et al.* 1993). O sistema MY09/11 tem sido predominantemente usado nos estudos epidemiológicos na América do Sul, América do Norte e Ásia (Bosch *et al.* 1995, Liaw *et al.* 1995), enquanto que o sistema GP5+/6+ tem sido usado principalmente na Europa (de Roda Husman *et al.* 1995, Jacobs *et al.* 1997).

Os produtos resultantes da amplificação por MY09/11 e GP5+/6+ apresentam cerca de 450 e 150 nucleotídeos, respectivamente (Figura 3), dentre os quais alguns são relativamente conservados, permitindo a utilização do mesmo par de *primers* para detectar mais de 25 genótipos de HPV (Gravitt *et al.* 1998, Kleter *et al.* 1999).

Os *primers* MY09/11 foram redesenhados para aumentar a sensibilidade na amplificação de diferentes tipos de HPV originando o *pool* de oligonucleotídeos, PGMY09 e PGMY11, que se ligam no mesmo local da região L1. Este novo sistema foi descrito por Gravitt *et al.* (2000). A utilização dos *primers* PGMY09/11 aumentou substancialmente a sensibilidade na amplificação tipo-específico de amostras infectadas com múltiplos tipos de HPV (Gravitt *et al.* 2000, Coutlée *et al.* 2002).

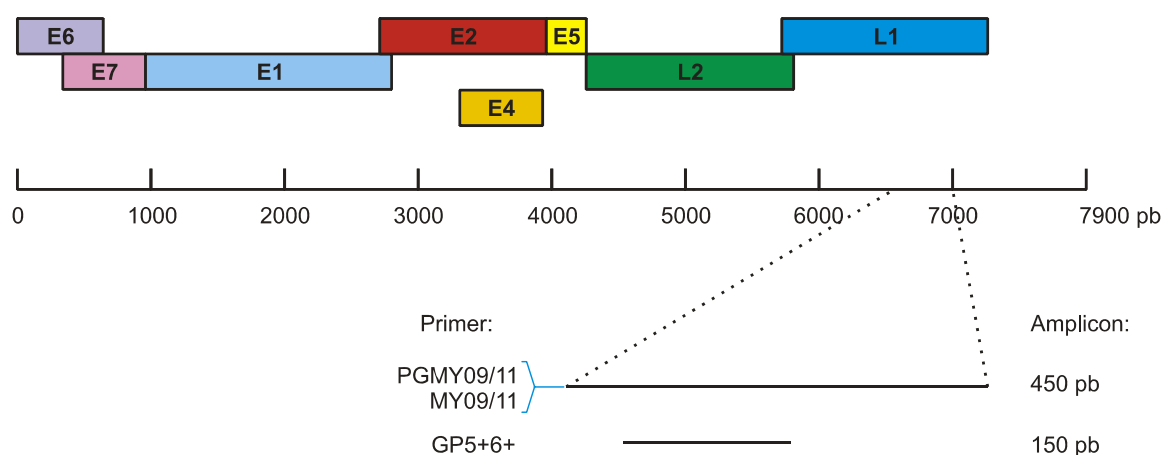


Figura 3: Representação esquemática da localização dos diferentes *primers* (PGMY09/PGMY11, MY09/MY11, GP5+/GP6+) no genoma do HPV. (Kleter *et al.* 1999).

Os métodos que utilizam a PCR oferecem algumas vantagens, tais como uma sensibilidade consideravelmente maior, a possibilidade de diferenciação ou tipagem dos vírus com base em suas seqüências genômicas, a quantificação da carga viral e a necessidade de pequenas quantidades de DNA, e por isso a PCR é considerada a técnica mais flexível e mais sensível quando comparada com as demais (Hubbard 2003).

1.5 Identificação genotípica do HPV

Para análise genotípica do HPV são escolhidas áreas do genoma viral que exibem um polimorfismo tipo-específico. O gene L1 parece ser o mais polimórfico, sendo freqüentemente usado em ensaios de genotipagem baseados em PCR (Meyer *et al.* 1995, Gravitt *et al.* 2000).

Vários métodos têm sido descritos para identificar os genótipos do HPV após a amplificação com os *primers* de consenso: a análise do polimorfismo dos fragmentos gerados por enzimas de restrição (RFLP, do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) (Bernard *et al.* 1994, Meyer *et al.* 1995, Wang *et al.* 1997, Wang *et al.* 1999, Kay *et al.* 2002, Hubbard 2003), as técnicas que permitem a diferenciação específica dos tipos de HPVs de alto e baixo risco oncogênico como a hibridização do DNA-HPV com sondas tipo-específicas (Hildesheim *et al.* 1994), hibridização em placa (Clavel *et al.* 1998) ou hibridização reversa *line blot* (Gravitt *et al.* 1998, Laconi *et al.* 2001, Perrons *et al.* 2002) e também o seqüenciamento direto de ácidos nucléicos (Chow *et al.* 2000, Vernon *et al.* 2000, Feoli-Fonseca *et al.* 2001). Alguns destes sistemas de tipagem apresentam várias desvantagens, tais como, a necessidade de múltiplas reações de hibridização e a sensibilidade limitada para a detecção de múltiplos genótipos de HPV em uma única amostra.

Pelo método de **RFLP** o DNA amplificado é digerido por enzimas de restrição, que são endonucleases que cortam DNA de dupla fita em seqüências específicas. As enzimas de restrição mais usadas são: *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*, *Rsa* e *Sau3*. A interpretação dos resultados da digestão em relação aos tipos de HPV às vezes é difícil, principalmente em casos de infecções múltiplas (Hubbard 2003). Além do mais, uma vez que os fragmentos de restrição não são, na prática, identificados por hibridização específica, a identificação de bandas espúrias pode dificultar a determinação dos genótipos (Meyer *et al.* 1995, Wang *et al.* 1999, Kado *et al.* 2001).

A **hibridização reversa** (*line blot*) detecta DNA amplificado tipo-específicos pela hibridização seletiva com oligonucleotídeos (sondas) imobilizados em membranas de nylon. Nesta técnica os genótipos individuais de HPV podem ser classificados com um nível muito alto de sensibilidade, o que é essencial em casos de infecções múltiplas (Bekkers *et al.* 2002, Perrons *et al.* 2002). O método descrito por Gravitt *et al.* (2000) permite a identificação de 27 tipos diferentes de HPV em uma única tira de hibridização.

O **seqüenciamento** direto do DNA viral a partir dos produtos de PCR pode ser usado para distinguir os genótipos de HPV presentes em amostras clínicas. Esta tecnologia permite identificar novos genótipos de HPV, bem como a presença de mutações em genótipos já conhecidos (Chow *et al.* 2000, Nelson *et al.* 2000, Vernon *et al.* 2000, Kado *et al.* 2001).

Os estudos epidemiológicos demonstram que a PCR associada ao ensaio de hibridização, seqüenciamento ou análise de fragmentos de restrição funcionam como padrão ouro na detecção e tipagem dos diversos tipos de HPV (Walboomers *et al.* 1999, Sun *et al.* 2002).

1.6 Justificativa

As estimativas de prevalência da infecção pelo HPV em mulheres na população mundial varia de 2% a 44% (Bosch & de Sanjose, 2003). Esta grande variação é explicada pelas diferenças na idade das populações estudadas e na sensibilidade dos testes empregados para a detecção da infecção. A prevalência é maior entre as mulheres jovens e o pico ocorre abaixo dos 25 anos de idade (Schiffman 1992, Herrero *et al.* 2000). A prevalência e a genotipagem do HPV em adolescentes do gênero feminino vem sendo estudada, especialmente nos países desenvolvidos (Richardson *et al.* 1999, Ludicke *et al.* 2001, Woodman *et al.* 2001). As taxas encontradas em diferentes estudos variam entre 13% a 33%, provavelmente devido ao uso de métodos com graus variáveis de sensibilidade.

No Brasil, poucos estudos avaliaram a prevalência da infecção por HPV em adolescentes, de acordo com o I Consenso Brasileiro de HPV, a prevalência varia de 19% a 33% em adolescentes sexualmente ativas (Carvalho *et al.* 2000). Contudo, em Goiás estes estudos são inexistentes.

O câncer de colo de útero em Goiás é um problema de saúde pública, uma vez que é a segunda causa de morte em mulheres (Rabelo-Santos *et al.* 2003, INCA 2004). Além disso, algumas pesquisas realizadas em Goiânia mostram que os adolescentes e jovens apresentam vários comportamentos sexuais considerados de risco para a infecção cervical pelo HPV (Guimarães *et al.* 1997, Monteiro 1999). Assim, um estudo sobre a detecção e a identificação genotípica do HPV, empregando métodos com alta sensibilidade e capazes de discriminar um amplo espectro de HPVs, em adolescentes sexualmente ativas de Goiânia, ampliará os conhecimentos da distribuição geográfica deste vírus e poderá ser importante para o estabelecimento de medidas preventivas eficazes nessa população.

2. OBJETIVOS

- Detectar o DNA-HPV em adolescentes sexualmente ativas da região noroeste do município de Goiânia, através de PCR.
- Identificar os genótipos de HPV, utilizando as técnicas de RFLP e hibridização *line blot*.

3. METODOLOGIA

O presente estudo fez parte de um grande projeto denominado: **“Estudo das doenças sexualmente transmissíveis em adolescentes do distrito sanitário noroeste do município de Goiânia: prevalência e validação do diagnóstico de cervicite por escore de risco e exame ginecológico”**. Os objetivos específicos deste projeto foram determinar a prevalência das infecções genitais por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e por papilomavirus humano, validar o uso de escore de risco e os dados do exame ginecológico para o diagnóstico de cervicite por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e estudar o comportamento sexual das adolescentes do gênero feminino, residentes neste distrito sanitário.

A população alvo do projeto foi constituída de 4091 adolescentes, do sexo feminino com idade entre 15 a 19 anos, atendidas pelas agentes de saúde do Programa Saúde da Família – PSF do distrito sanitário noroeste do município de Goiânia-GO.

A amostra estimada foi de 588 adolescentes sexualmente ativas, com precisão de 1,5%, prevalência mínima esperada de 4% para as DST estudadas, estimativa de 60% de adolescentes sexualmente ativas e índice de recusa de 10%. Foi então planejada a convocação de 1078 adolescentes. Para isso realizou-se um sorteio aleatório sistemático entre as famílias que tinham adolescentes do gênero feminino com idade entre 15 a 19 anos. O projeto piloto mostrou taxa de 51% de adolescentes sexualmente ativas e a amostra foi recalculada para 1764, considerando-se o índice de comparecimento obtido de 50%.

A amostra final foi composta por 914 adolescentes, das quais 472 eram sexualmente ativas e 432 realizaram exame ginecológico, incluindo coleta de material para diagnóstico de infecção por papilomavirus humano (HPV).

Todas as adolescentes eram inicialmente entrevistadas por médica de adolescentes ou enfermeira treinada, através de questionário contendo questões sociodemográficas e de saúde, incluindo início da vida sexual (Anexo 1). As adolescentes que não eram sexualmente ativas eram orientadas sobre as questões de saúde ou encaminhadas para consulta médica e/ou vacinação quando necessário. As adolescentes sexualmente ativas eram encaminhadas para consulta ginecológica, onde respondiam um questionário, contendo questões sobre prática sexual, vida reprodutiva e sintomas ginecológicos.

3.1 Obtenção e processamento das amostras

Durante o exame ginecológico, após a limpeza do colo para a retirada do excesso de muco, coletaram-se células cervicais do colo do útero (ectocérvix e endocérvix), destinadas à análise, através de uma escova do tipo “cytobrush”. As células foram desprendidas da escova através de imersão em um tubo Falcon de 7 mL contendo 1 mL de tampão fosfato estéril TE (TRIS 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM pH 8,0). Após agitação rigorosa a escova foi desprezada e o tubo tampado. As amostras foram transportadas sob refrigeração, no mesmo dia, para o Laboratório de Imunologia Celular do IPTSP/UFG, onde foram estocadas entre 2° e 8°C, por no máximo três dias. A seguir, os tubos contendo as amostras foram homogeneizados em vórtex e a suspensão de células foi dividida em duas alíquotas de 500 µL em tubos Eppendorf, e congeladas a -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.2 Extração do DNA

As amostras foram inicialmente tratadas com proteinase K 200 µg/ml, promoveu-se a homogeneização em vórtex e incubou-se em banho-maria a 56°C “overnight”, mantendo-se os tubos bem tampados.

O DNA total foi extraído adicionando-se solução de fenol-clorofórmio-isoamílico (25:24:1) pH 8,0 em cada amostra, volume a volume. Após homogeneizar cuidadosamente, os tubos foram centrifugados a 4°C em velocidade de 13000 a 15000 rpm por cinco minutos. A fase aquosa foi coletada em um novo tubo Eppendorf, desprezando-se a interface e a fase orgânica em água corrente. Se ainda houvesse proteína visível na interface, repetiam-se os procedimentos de extração com o fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Clewley 1991, Coutlée 1997).

3.3 Precipitação e Purificação do DNA

A precipitação do DNA foi realizada acrescentando-se a 400 µL da amostra, 800 µL de etanol PA e 40 µL de NaCl 5 N e incubando-se a -20°C “overnight”. O DNA precipitado foi submetido à centrifugação em 14000 rpm por 15 minutos. Após esse período, descartou-se o sobrenadante, o tubo foi invertido rapidamente em papel de filtro para retirar o excesso de líquido e lavou-se o DNA precipitado duas vezes com etanol a 70% para retirar o excesso de fenol. Após secagem à temperatura ambiente, o *pellet* foi finalmente eluído em 100 µL de TE. O DNA assim obtido foi estocado em freezer a -20°C até a realização da PCR.

3.4 Detecção do DNA-HPV utilizando-se a PCR

A PCR foi realizada com os *primers* de consenso PGMY09/PGMY11, descritos no quadro 1, que foram projetados para aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade da PCR (Gravitt *et al.* 2000, Coutlée *et al.* 2002).

Quadro 1: *Primers* PGMY empregados na PCR.

Designação do primer	Seqüência do primer (5' - 3')
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I*	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P*	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01**	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

* PGMY09-I e PGMY09-P têm 18 pb em extensão. As duas primeiras bases 5' foram deletadas para reduzir a estrutura secundária interna do oligonucleotídeo.

** HMB01 é substituído na região 3' de outros genótipo de HPV para evitar a formação de estrutura secundária e pareamento interno (Gravitt *et al.* 2000).

Os *primers* PGMY09/11 amplificam um fragmento de aproximadamente 450 pares de base (pb) da região L1 do genoma do HPV.

A PCR foi realizada empregando-se 1,5 µL de cada primer (25 µM, *Integrated DNA Technologies*), 10 µL de tampão para PCR 10x, 10 µL dNTP's (2 mM, *Amersham Biosciences*), 16 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL de AmpliTaq Gold DNA polimerase (5 U/µL, *Applied Biosystems*), 4,0 µL de DNA e água milli-Q autoclavada q.s.p 100 µL. A amplificação foi realizada em termociclador Thermo Hybaid PCR Express Thermal Cyclor, com o programa apresentado no Quadro 2.

Quadro 2: Programa para amplificação do DNA.

Programa	Tempo / temperatura
HOLD – 1 ciclo	13 min. 95 °C
CICLO – 40 ciclos	1 min. 95 °C; 1 min. 55 °C; 1 min. 72 °C
HOLD – 1 ciclo	5 min. 72 °C
HOLD	4 °C

Em todas as reações foram usados controle positivo para o DNA-HPV (SiHa-HPV16) e negativo (água destilada). Para a análise dos produtos da amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. Foram consideradas positivas para o DNA-HPV, as amostras que apresentaram uma banda de aproximadamente 450 pb, quando comparada com um marcador de peso molecular (100 pb *ladder* – PhiX174RFDNA/HaeIII, *Invitrogen Life Technologies*), incluído em cada eletroforese.

A qualidade do DNA foi avaliada pela detecção e amplificação de 110 pb do gene da β -globina humana, empregando os *primers* PCO3/PCO4. As amostras positivas para globina, e que não apresentaram bandas na PCR com os *primers* PGMY09/PGMY11, foram consideradas negativas para HPV.

3.5 Identificação genotípica do HPV por RFLP

Alíquotas do produto da PCR de cada amostra positiva para o DNA do HPV, utilizando os *primers* PGMY09/PGMY11, foram tipadas de acordo com o padrão de bandas geradas a partir da digestão do produto da PCR empregando as enzimas de restrição: *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*, *RsaI* e *Sau3aI* (Ting *et al.* 1990).

Em um tubo de 1,5 mL foi preparada uma mistura contendo 70 μ L do produto da PCR, 8 μ L de tampão E4 para enzimas de restrição (TRIS-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 7 mM, β -mercaptoetanol 7 mM e 0,1% de

soroalbumina bovina) e 2 μ L de água milli-Q autoclavada, a enzima Sau3aI tinha o seu tampão próprio. Foram transferidos 9,5 μ L dessa mistura para sete tubos de 1,5 mL, previamente identificados com o nome de cada enzima e 9,5 μ L para um tubo sem enzima, que serviu como controle negativo da digestão. Adicionou-se 0,5 μ L de cada enzima de restrição aos respectivos tubos, que foram incubados a 37°C *overnight* para ocorrer a digestão.

Após esse período, as enzimas foram inativadas a 65°C por dez minutos. Acrescentou-se 2 μ L de tampão Ficoll (3 mL de Ficoll, 1 mL de xilenocyanol a 5%, 1 mL de bromofenol a 5% e água q.s.p para 20 mL) em todas as amostras e os produtos das diferentes digestões foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8%, numa ordem registrada, juntamente com um padrão de DNA com pesos moleculares conhecidos (PhiX174RFDNA/HaeIII).

As amostras foram então submetidas à eletroforese. Os fragmentos foram visualizados após a coloração com uma solução de nitrato de prata e comparados aos mapas de restrição dos diferentes tipos de HPV (Anexo 2) (Bernard *et al.* 1994).

3.6 Identificação genotípica do HPV através de hibridização reversa (*line blot*)

Esta técnica foi realizada no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em São Paulo, sob a supervisão da Dra. Luisa Villa, utilizando tiras de hibridização (*Roche Molecular Systems, Inc.*).

As tiras de genotipagem do HPV são membranas de nylon contendo 29 sondas de oligonucleotídeos específicas para 27 tipos individuais de HPV e 2 sondas para β -globina (β -globina *high* e *low*) (Gravitt *et al.* 1998).

Um esquema do procedimento realizado da hibridização line blot está apresentado na Figura 4. A PCR foi realizada empregando os primers PGMY09/11, PCO4 e GH20 (β -globina) biotinilados de acordo com a técnica descrita no item 3.4. Em 40 μ L de produto de PCR acrescentou-se 40 μ L de solução de

desnaturação (NaOH 0,13 N).

Colocou-se as tiras rotuladas nas bandejas e adicionou-se 3 mL de solução de hibridização pré-aquecida a 53°C. Em seguida, foram aplicados 75 µL do produto da PCR desnaturado sobre as tiras e as bandejas mantidas a 53 °C sob agitação durante 40 minutos. Após esse período, desprezou-se a solução de hibridização, e lavou-se com 3 mL de solução de lavagem a temperatura ambiente (t.a). Posteriormente, incubou-se com 3 mL de solução de lavagem pré-aquecida durante 15 minutos a 53°C. Após desprezar a solução de lavagem, incubou-se com 3 mL de conjugado (estreptavidina – peroxidase (HSP)) agitando-se por 30 minutos a t.a. As tiras foram novamente lavadas com 3 mL de solução de lavagem e incubadas nesta solução a 53°C repetindo o processo citado anteriormente. A seguir lavou-se as tiras com 3 mL de citrato de sódio 0,1 M durante 10 minutos a t.a. Após a remoção da solução de citrato, incubou-se com 3 mL de solução contendo o substrato cromógeno (H₂O₂ + tetrametilbenzidina-TMB em dimetilformamida) por 8 minutos a t.a no escuro. Finalmente, lavou-se as tiras com água, deixando-as em solução de citrato 0,1 M, entre 2 e 8°C por até 3 dias antes da interpretação dos resultados.

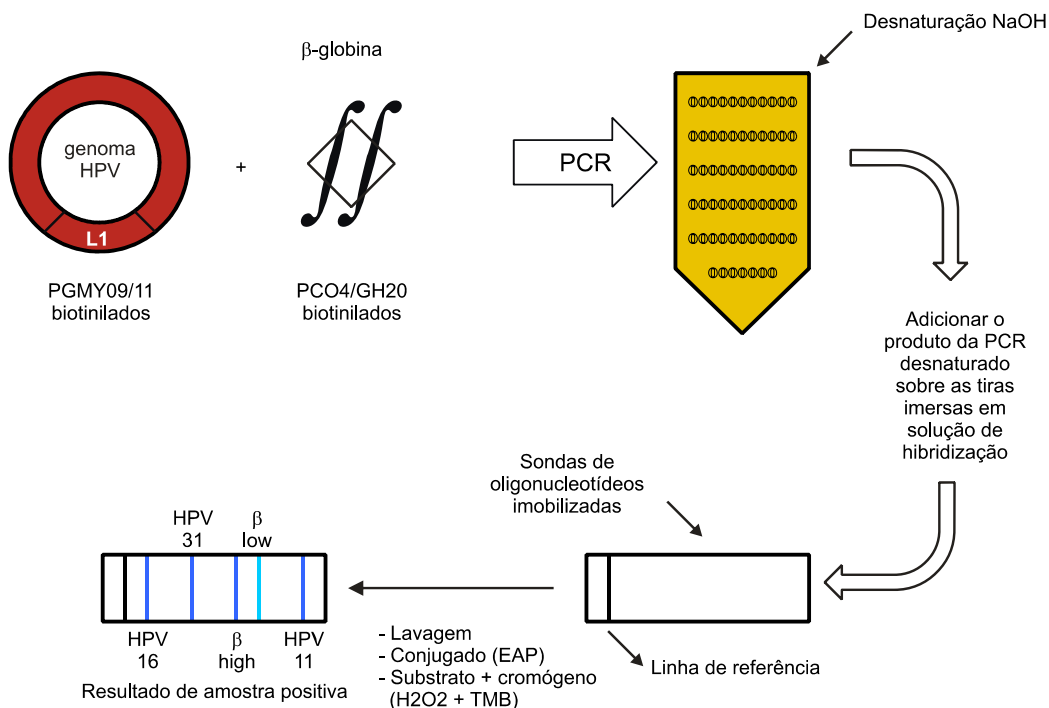


Figura 4: Representação esquemática da genotipagem do HPV em produto de

PCR pelo método de hibridização reversa *line blot* (Gravitt *et al.* 1998).

As tiras foram acondicionadas em sacos plásticos vedados e guardadas no escuro. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com a legenda padrão para os tipos de HPV representada na Figura 5.

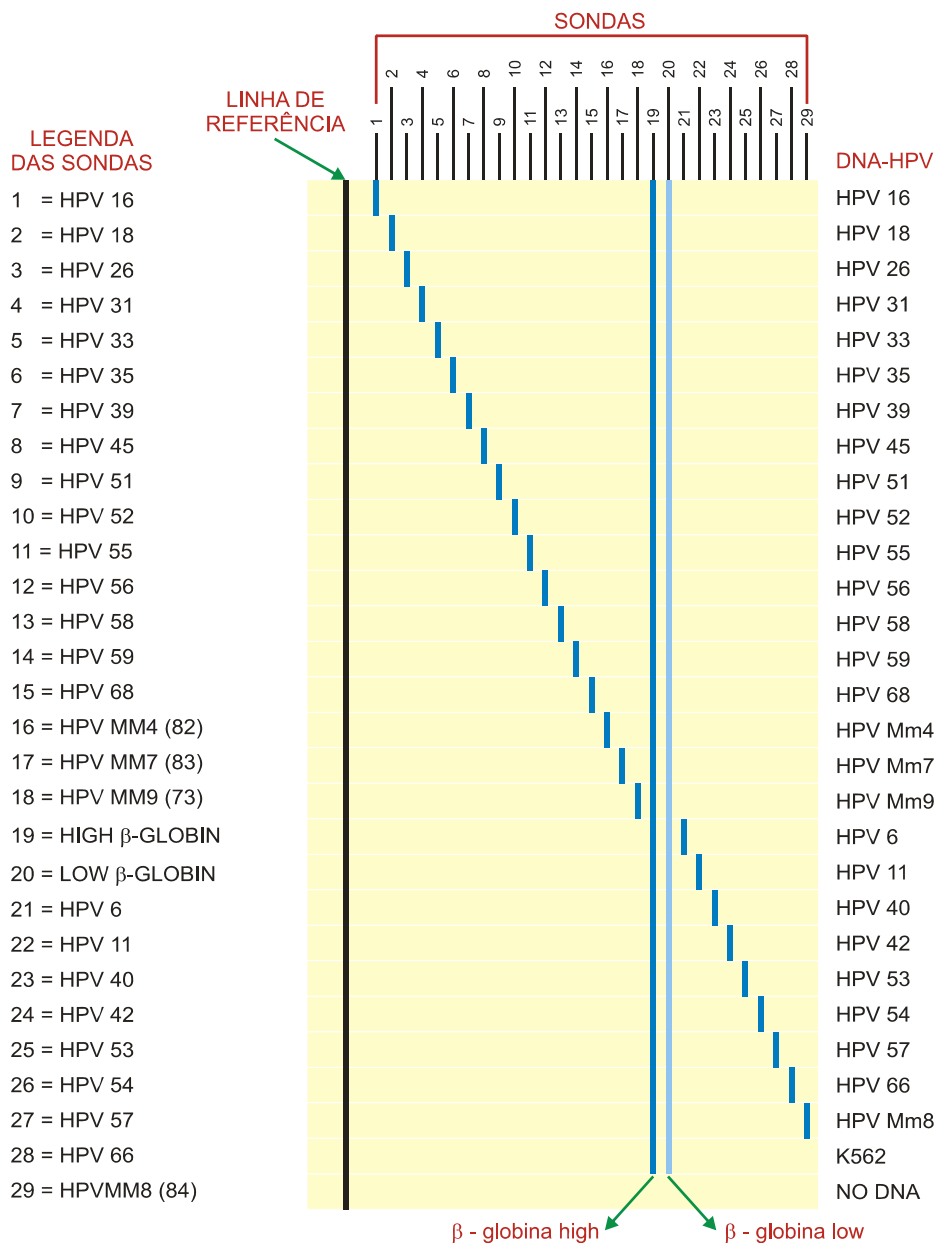


Figura 5: Esquema de sondas na tira de genotipagem do HPV (Gravitt *et al.* 1998).

Os tipos de HPV de alto e baixo risco são visivelmente separados pelas linhas de controle da β-globina, onde os tipos localizados entre a linha de

referência e a linha de controle da β -globina estão associados com alto risco oncogênico. Já os tipos abaixo das linhas de controle são de baixo risco oncogênico, exceto o HPV 66 que é considerado de alto risco. De acordo com IBSCC (do inglês, *International Biological Study on Cervical Cancer*), foram considerados HPVs de alto risco oncogênicos aqueles detectados como uma infecção única em câncer cervical (Bosch *et al.* 1995, Gravitt *et al.* 1998).

3.7 Processamento e análise dos dados

O processamento e análise dos dados foram realizados utilizando o programa EpiInfo versão 6.0 (Dean *et al.*, 2003). Foi realizada a análise descritiva das principais características sócio-demográficas e da prevalência pelo HPV, com respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.8 Considerações éticas

Considerando-se os aspectos éticos, o projeto foi denominado “Adolescer com saúde” para que não houvesse identificação pública das adolescentes sexualmente ativas. Todas as entrevistas foram realizadas em local privado, sendo assegurada a confidencialidade para as adolescentes. Todas as participantes foram devidamente informadas sobre os objetivos da pesquisa e assinaram os termos de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3 e 4). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo 081/2001 – Anexo 5).

O projeto desta pesquisa foi aprovado e financiado pelo Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS – UNESCO (CFA 670/01) e apoiado pela Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia/GO.

4. RESULTADOS

4.1 Características sócio-demográficas da população estudada

No período entre agosto de 2002 a setembro de 2003 foram selecionadas as 432 adolescentes que participaram do estudo.

A média da idade das adolescentes foi de $17,2 \pm 1,3$ anos; a maioria era solteira (67,9%) e as com parceiro fixo (casadas ou vivendo em união consensual) representavam 32,1% das participantes; 57% tinham 8 anos ou menos de escolaridade e 46,8% tinham renda familiar inferior a dois salários mínimos (Tabela 1).

Tabela 1: Características sócio-demográficas das adolescentes sexualmente ativas do Distrito Sanitário Noroeste do Município de Goiânia, GO, 2003.

Variáveis	n	%
Idade (anos)		
15	54	12,5
16	87	20,1
17	96	22,2
18	107	24,8
19	88	20,4
Total	432	100,0
Estado civil		
Solteira	291	67,4
Casada	141	32,6
Total	432	100,0
Nível de escolaridade		
Até 4 anos	19	4,4
5 a 8 anos	228	52,8
> 8 anos	184	42,6
Não sabe /Não respondeu	1	0,2
Total	432	100,0
Renda familiar (salário mínimo)		
< 2 SM	200	46,3
2 a 4 SM	159	36,8
> 4 SM	49	11,3
Não sabe/Não respondeu	24	5,6
Total	432	100,0

SM = salário mínimo.

4.2 Detecção do DNA-HPV

O DNA-HPV foi detectado em 121 das 432 amostras submetidas a PCR utilizando os *primers* PGMY09/11 (Figura 6) o que correspondeu a uma prevalência de 28% (IC95% 23,8-32,5).

Todas as 432 amostras de DNA amplificaram para o gene da β -globina, confirmando a adequação do DNA extraído.

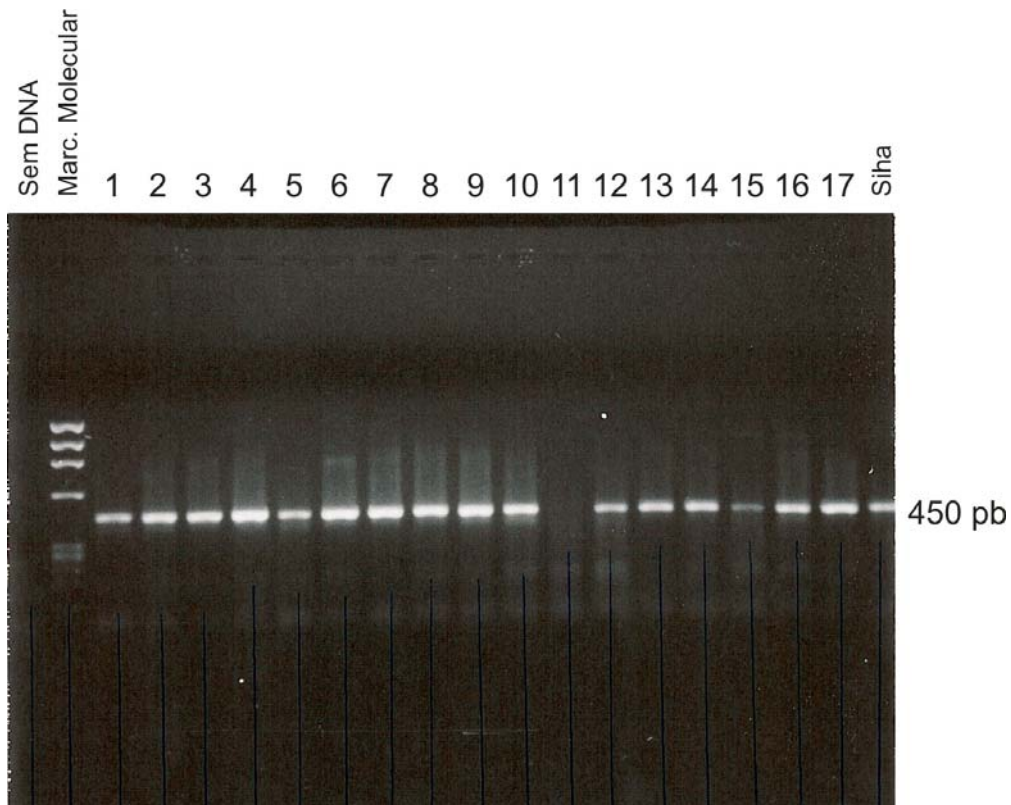


Figura 6: Produtos da PCR empregando os primers PGMY09/11. Os produtos amplificados (450 pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo. As canaletas de 1 - 10 e de 12 - 17 contém amostras positivas para o DNA-HPV, a 11 corresponde a uma amostra negativa, a 18 ao controle positivo (Siha: HPV-16), o marcador de peso molecular utilizado foi o ϕ X174/HAE.

4.3 Genotipagem do HPV

Para a identificação genotípica das 121 amostras positivas para o DNA-HPV, foram utilizadas as técnicas de RFLP e hibridização *line blot*. Na Figura 7 está representada a genotipagem do HPV-16 pela RFLP.

PND 1 2 M 3 4 5 6 7

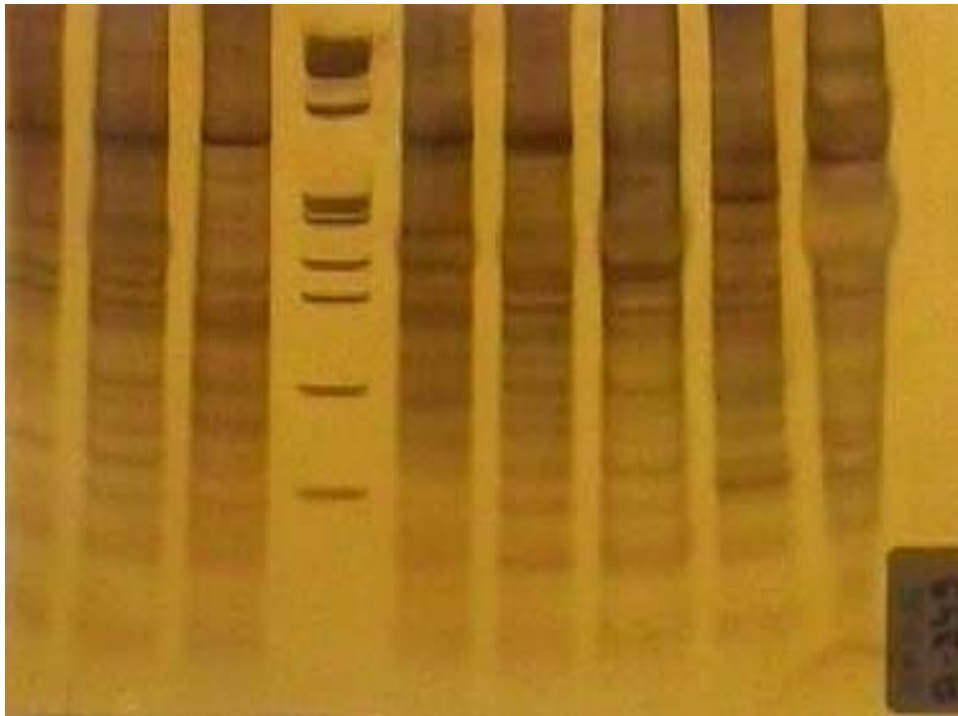


Figura 7: Identificação genotípica do HPV16 (amostra 349) utilizando a técnica de RFLP. O produto amplificado com PGMY09/11 foi submetido à digestão com as enzimas de restrição (canaleta 1: BamHI, 2: DdeI, 3: HaeIII, 4: HinfI, 5: PstI, 6: RsaI e 7: Sau3aI).

Alguns resultados da genotipagem empregando as tiras de hibridização *line blot* foram exemplificados na Figura 8.

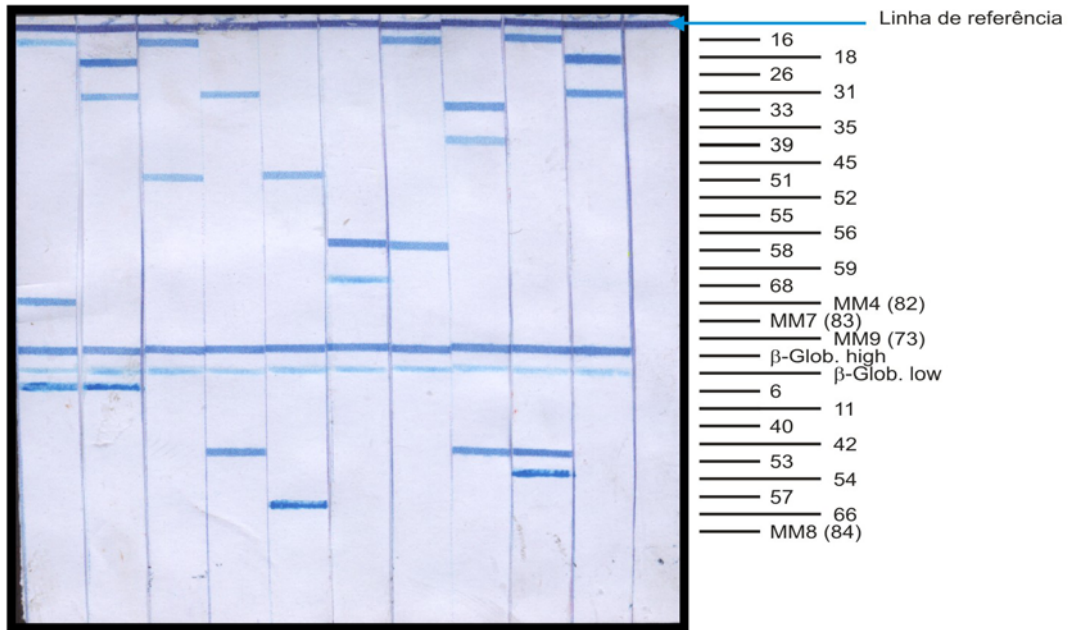


Figura 8: Identificação genotípica do HPV através de hibridização *line blot*. Cada linha representa um tipo de HPV. As tiras de 1-10 mostram os resultados de 10 amostras diferentes (A-48, A-52, A-69, A-70, A-77, A-140, A-160, A-182, A-189 e A-239 respectivamente). A tira 11 é o controle negativo da reação (H₂O).

Através da RFLP e hibridização *line blot* foram identificados 30 tipos diferentes de HPV e os mais freqüentes foram os de alto risco oncogênico. Como citado anteriormente na metodologia (item 3.6) a hibridização *line blot* permite a identificação de 27 tipos diferentes do HPV. No presente estudo, empregando essa técnica, foram identificados 25 tipos do HPV exceto os tipos 83 e 57. Cinco tipos do HPV (44, 61, 62, 70 e 89) só foram identificados através da RFLP.

O HPV-16 foi o tipo predominante (24%), seguido pelos HPVs 51 (18,2%), 31 (16,5%), 52 (14,9%) e 18 (12,4%) (Tabela 2).

Tabela 2: Prevalência geral dos genótipos do HPV determinada através da RFLP e hibridização *line blot*.

GENÓTIPO	N	POPULAÇÃO HPV POSITIVA (n = 121) (%)	POPULAÇÃO GERAL (n = 432) (%)
Alto risco oncogênico			
HPV-16	29	24	6,7
HPV-51	22	18,2	5,1
HPV-31	20	16,5	4,6
HPV-52	18	14,9	4,2
HPV-18	15	12,4	3,5
HPV-53	11	9,0	2,5
HPV-58	10	8,3	2,3
HPV-39	09	7,4	2,1
HPV-45	06	4,9	1,4
HPV-66	06	4,9	1,4
HPV-73	06	4,9	1,4
HPV-26	04	3,3	0,9
HPV-33	04	3,3	0,9
HPV-56	04	3,3	0,9
HPV-68	04	3,3	0,9
HPV-35	02	1,6	0,4
HPV-55	02	1,6	0,4
HPV-70	02	1,6	0,4
HPV-59	01	0,8	0,2
HPV-82	01	0,8	0,2
Baixo risco oncogênico			
HPV-6	07	5,8	1,6
HPV-42	05	4,1	1,2
HPV-54	05	4,1	1,2
HPV-40	03	2,5	0,7
HPV-84	03	2,5	0,7
HPV-61	02	1,6	0,4
HPV-62	02	1,6	0,4
HPV-11	01	0,8	0,2
HPV-44	01	0,8	0,2
HPV-89	01	0,8	0,2

Em 44,8% das adolescentes DNA-HPV positivas foram encontradas infecções múltiplas. O HPV-16 foi o tipo predominante, sendo encontrado em 21 das 54 amostras, o que correspondeu a uma prevalência de 39%. Outros HPVs

também freqüentes nas infecções múltiplas foram o 51 (33% 18/54), 18 e 31 (22% 12/54), 53 (20% 11/54), 52 (18% 10/54) (Tabela 3).

Tabela 3: Freqüência dos genótipos do HPV em infecções únicas e múltiplas.

GENÓTIPO HPV	INFECÇÃO ÚNICA (n)	INFECÇÃO MÚLTIPLA (n)
Alto risco oncogênico		
HPV-16	08	21
HPV-18	03	12
HPV-26	02	02
HPV-31	08	12
HPV-33	01	03
HPV-35	-	02
HPV-39	01	08
HPV-45	05	01
HPV-51	04	18
HPV-52	08	10
HPV-53	-	11
HPV-55	01	01
HPV-56	02	02
HPV-58	02	08
HPV-59	-	01
HPV-66	03	03
HPV-68	01	03
HPV-70	02	-
HPV-73	04	02
Baixo risco oncogênico		
HPV-6	01	06
HPV-11	01	-
HPV-40	02	01
HPV-42	02	03
HPV-44	01	-
HPV-54	03	01
HPV-61	02	-
HPV-62	-	02
HPV-82	-	01
HPV-84	-	03
HPV-89	-	01
PNI	-	01

Nas infecções múltiplas foram encontrados até cinco tipos diferentes do HPV. Em uma delas (A-49) foram encontrados o HPV-6 e um HPV não identificado (PNI - positivo não identificado) (Tabela 4).

Tabela 4: Ocorrência de infecções múltiplas de acordo com os tipos de HPV (n=54).

Amostra	Tipos de HPV
A-01	6, 39, 52 e 73
A-06	16 e 51
A-08	18, 31, 39 e 51
A-09	33 e 53
A-16	52 e 84
A-23	16, 35 e 58
A-26	26 e 84
A-27	6 e 53
A-36	16, 31 e 51
A-37	16, 31 e 51
A-44	16, 18, 31, 51 e 52
A-48	6, 16 e 82
A-49	6 e <i>PNI</i>
A-52	6, 18 e 31
A-69	16 e 51
A-70	31 e 53
A-77	51 e 66
A-90	55, 56, 58 e 68
A-99	52 e 56
A-132	51 e 18
A-139	51 e 52
A-140	58 e 68
A-143	51 e 58
A-160	16 e 58
A-175	16 e 52
A-178	16 e 89
A-182	33, 39 e 53
A-189	16, 53 e 54
A-204	18 e 40
A-222	52 e 62
A-236	31 e 35

continua

continuação

Amostra	Tipos de HPV
A-239	18 e 31
A-250	31, 42 e 66
A-263	18, 53 e 58
A-270	39 e 51
A-277	16, 39, 51 e 73
A-299	16, 31, 33 e 51
A-306	26 e 62
A-331	18, 51 e 66
A-332	18 e 58
A-336	16 e 53
A-354	6 e 16
A-355	31, 39, 52, 58 e 51
A-363	16, 53 e 84
A-398	16 e 51
A-400	39, 51 e 53
A-423	16, 18, 42 e 59
A-425	16 e 51
A-441	16 e 52
A-445	52, 53 e 54
A-454	16 e 39
A-455	31 e 42
A-466	18 e 53
A-473	18 e 45

PNI = positivo não identificado

As associações mais frequentes do HPV-16 nas infecções múltiplas foram com os HPVs 51 (42,8% 9/21), 31 (19% 4/21), 52 e 53 (14,3% 3/21) e 6, 18, 39 e 58 (9,5% 2/21).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada a detecção e a genotipagem do DNA-HPV em 432 amostras endocervicais de adolescentes sexualmente ativas do distrito sanitário Noroeste de Goiânia, com idade entre 15 e 19 anos, empregando a PCR, RFLP e hibridização *line blot*. O DNA-HPV foi encontrado em 28% (IC 95% 23,8 - 32,5) das amostras. Esses dados são consistentes com outros estudos sobre a prevalência da infecção cervical pelo HPV envolvendo adolescentes e jovens do gênero feminino, como mostrado por Bauer *et al.* (1991) (33%), Ho *et al.* (1998) (26%), Nonnenmacher *et al.* (2002) (27,9%) e Matos *et al.* (2003) (25,2%). Richardson *et al.* (2003) também encontraram taxa de prevalência semelhante (29%), porém, em mulheres com idade um pouco superior (média de idade = 23 anos, variação 17 - 42 anos).

Outras pesquisas mostram taxas inferiores à encontrada nesse estudo, como a de Martinez *et al.* (1988) (13%), Moscicki *et al.* (1990) (15%), Moscicki *et al.* (1992) (18,4%), Shew *et al.* (1994) (19,2%), Evander *et al.* (1995) (21%), Richardson *et al.* (1999) (22%), Sellors *et al.* (2000) (20%), Woodman *et al.* (2001) (19%) e Winer *et al.* (2003) (19,7%). Essas diferenças nas taxas de prevalência podem ser explicadas pela variação das populações estudadas e dos métodos utilizados para a detecção do DNA-HPV.

Atualmente os testes mais amplamente utilizados para pesquisa do HPV são a captura híbrida II (Digene), capaz de detectar 13 tipos de HPV de alto risco e 5 tipos de baixo risco (Vernon *et al.* 2000, Terry *et al.* 2001), e a PCR com os *primers* genéricos MY09/11 (Qu *et al.* 1997, Harnisch *et al.* 1999). Para melhorar a detecção do HPV os *primers* MY09/11 foram redesenhados por Gravitt *et al.* (2000) e foi demonstrado que a PCR-PGMY melhorou a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da PCR-MY. O aumento na sensibilidade é atribuído em parte ao uso da enzima Ampli Taq Gold DNA polimerase (Coutlée *et*

al 2002, Kornegay *et al.* 2003, Giovanelli *et al* 2004). No presente estudo, foi empregado o sistema PCR-PGMY e nas 432 amostras endocervicais testadas o DNA-HPV foi amplificado em 121 amostras. Todas as 311 amostras negativas amplificaram com o gene da β globina, excluindo a possibilidade de inadequação do DNA ou inibição na PCR. Este sistema de *primers* também foi utilizado recentemente para detecção do DNA-HPV em amostras endocervicais (Agorastos *et al* 2004, Giovanelli *et al.* 2004).

Neste estudo, os produtos da amplificação foram genotipados através das técnicas de RFLP e hibridização reversa *line blot* e foi possível identificar 30 genótipos diferentes de HPV. Os cinco tipos de HPV mais freqüentes na população geral foram os de alto risco oncogênico predominando o HPV-16 (6,7%) seguido pelos HPVs 51 (5,1%), 31 (4,6%), 52 (4,2%) e 18 (3,5%). Os HPVs de alto risco oncogênico também foram mais freqüentes no estudo de Bauer *et al.* (1999), HPV-16 (9%), HPV-18, 31 e 52 (5%), porém, no de Richardson *et al.* (2003), o HPV-16 foi o mais freqüente (7%) seguido pelos de baixo risco oncogênico, HPV-53 (4,3%) e HPV-84 (3,8%). A prevalência de infecções cervicais pelo HPV tem sido investigada em muitos estudos (IARC-1995). Contudo, a variação na distribuição geográfica dos tipos do HPV não está bem documentada, exceto do HPV-16 que parece ser o mais freqüentemente encontrado na maioria dos países (Wheeler *et al.* 1993, Hildesheim *et al.* 1994, Ho *et al.* 1998, Franco *et al.* 1999, Liaw *et al.* 1999, Woodman *et al.* 2001). Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios que apontam uma maior prevalência do HPV-16 na população geral ou nas amostras HPV positivas (Ho *et al.* 1998, Woodman *et al.* 2001, Richardson *et al.* 2003).

De acordo com a literatura, a RFLP permite a identificação de um amplo espectro de tipos de HPV de mucosas, bem como a identificação de novos tipos que posteriormente são confirmados pelo sequenciamento (Bernard *et al.* 1994, Kay *et al.* 2002). No presente estudo o uso da técnica de RFLP foi importante, pois possibilitou identificar cinco tipos de HPV não tipados pela hibridização *line blot*. No entanto, a RFLP apresentou algumas limitações em relação à sua interpretação, como o aparecimento de bandas inespecíficas que dificultaram a determinação do genótipo de HPV e ainda, o grande número de bandas geradas através da digestão com as sete enzimas de restrição utilizadas (*BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*,

RsaI e *Sau3aI*), impossibilitou a identificação de todos os genótipos presentes em infecções múltiplas, especialmente naquelas com três ou mais tipos de HPV.

A genotipagem do HPV pela hibridização reversa *line blot* tem mostrado uma sensibilidade maior e uma discriminação específica entre 27 tipos de HPV em infecção única e, principalmente, em infecções múltiplas (Gravitt *et al.* 1998, van den Brule *et al.* 2002). Através da *line blot* foram identificados 25 tipos diferentes de HPV, sendo que apenas os HPVs 83 e 57 não foram encontrados nas amostras analisadas. O uso dessa técnica foi fundamental para a identificação das infecções múltiplas nas amostras das adolescentes, o que não foi possível pela RFLP. A prevalência de infecções múltiplas foi elevada nas amostras DNA-HPV positivas (44,8%), resultado semelhante ao encontrado por Richardson *et al.* (2003) (38%) e Matos *et al.* (2003) (45,8%). Contudo, outros autores mostraram taxas inferiores de infecções múltiplas (Moscicki *et al.* (1990) 8,8%, Bauer *et al.* (1991) 13%, Evander *et al.* (1995) 14%, Sellors *et al.* (2000) 17%), em população de adolescentes e jovens do gênero feminino. Este fato está provavelmente relacionado com a utilização de técnicas menos sensíveis e que identificam um menor espectro de tipos de HPV do que o teste aqui empregado.

As infecções múltiplas apresentaram até cinco tipos de HPV, sendo os de alto risco oncogênico os mais prevalentes, HPV-16 (39%) seguido dos HPVs tipo 51 (33%), 18 e 31 (22%) e 53 e 52 (18%). Num estudo publicado recentemente por van der Graaf *et al.* (2002), os autores concluíram que a presença de múltiplos tipos de HPV numa amostra cervical pode estar associada com uma maior probabilidade de desenvolvimento de câncer cervical.

Rousseau *et al.* (2003a e 2003b), demonstraram que a co-infecção pelo HPV depende da idade, sendo a idade jovem um forte preditor para as co-infecções. Nossos resultados confirmam esta associação. Provavelmente as mulheres jovens apresentam uma maior prevalência de infecções múltiplas por não terem uma resposta imunológica eficaz em decorrência da menor exposição ao vírus.

Este trabalho faz parte de um amplo estudo de corte transversal, de base populacional, realizado em adolescentes do sexo feminino do distrito sanitário noroeste de Goiânia, onde se avaliou o comportamento sexual e conhecimentos

sobre DST, bem como a prevalência de alterações citológicas e de outras DST, como a infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoea* e os fatores de risco sócio-demográficos e de comportamento sexual associados. A determinação dos fatores associados à infecção única ou múltipla pelo HPV será feita posteriormente.

É o primeiro estudo realizado em Goiás, empregando-se a amplificação do DNA-HPV com o sistema de *primers* de consenso PGMY09/11 e a caracterização genotípica por RFLP e hibridização *line blot*. Estas técnicas permitiram a identificação de um amplo espectro de genótipos do HPV, especialmente de alto risco oncogênico, em adolescentes sexualmente ativas, grupo de alto risco para esta infecção. A realização de estudos prospectivos será importante para avaliar a evolução dessas infecções, tanto em relação ao aspecto citológico quanto à persistência viral e aquisição de novos tipos de HPV. Estes conhecimentos serão importantes para a definição dos tipos de HPV que deverão ser utilizados em vacinas nesse grupo populacional.

CONCLUSÕES

- A prevalência encontrada para o DNA-HPV, empregando a PCR-PGMY09/11, em adolescentes sexualmente ativas da região noroeste de Goiânia foi elevada.

- Através da RFLP e hibridização *line blot* foi possível identificar 30 genótipos diferentes do HPV sendo os mais prevalentes os de alto risco oncogênico. A última metodologia foi fundamental na identificação de infecções múltiplas, na população estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agorastos T, Dinas K, Lloveras B, Bosch FX, Kornegay JR, Bontis JN, de Sanjose S. 2004. Cervical human papillomavirus infection in women attending gynaecological outpatient clinics in northern Greece. *Eur J Cancer Prev* 13: 145-147.

Almeida G, Val IC. 2002. Apresentação de resumos selecionados. 19TM International Papillomavirus Conference, 1 a 7 Set 2001, Florianópolis-SC, Brasil. *DST-. J Bras Doenças Sex Trasm* 14: 39-51.

Baay MF, Quint WG, Koridstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Stolz E, and Herbrink P. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 34: 745-747.

Barrasso R. 2000. HPV viral typing. *Gynecol Obstet Fertil* 28: 189.

Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chinnera J, Reingold A, and Manos MM. 1991. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*. 265: 472-477.

Bekkers RL, Melchers WJ, Bakkers JM. 2002. The role of genotype-specific human papillomavirus detection in diagnosing residual cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 102: 148-151.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. 1994. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077-1085.

Borysiewicz LK, Fiander A, Minako N, Mon S, Wilkinson GWG, Westmoreland D, Evans AS, Adam M, Stacey SN, Boursnell MEG, Rutherford E, Hickling JK, Inglis SC. 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347: 1523-1527.

Bosch FX, de Sangose S. 2003. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31: 3-13.

Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55: 244-265.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N. 1995. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group: prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87: 796-802.

Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2003. Disponível na internet: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 28/08/2004.

Broker TR. 1987. Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet Gynecol North Am* 14: 329.

Carvalho JJM, Oyakawa N. 2000. Papilomavirus humano In: I Consenso Brasileiro de HPV. São Paulo: BG Cultural.

Cho NH, Joo HJ, Ahn HJ, Jung WH, Lee KG. 1998. Detection of human papillomavirus in warty carcinoma of the uterine cervix: comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization and in situ polymerase chain reaction methods. *Pathol Res Pract* 194: 713-720.

Chow VT, Loh E, Yco WM, Tan SY, Chan R. 2000. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathol* 32: 204-208.

Clavel C, Rihet S, Masure M, Chypre C, Boulanger JC, Quereux C, and Birembaut P. 1998. DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR. *J Clin Pathol* 51: 38-43

Clewley JP, 1991. Methods in Gene Technology: The Polymerase Chain Reaction: basic procedures and use for virus detection. *JAI Press Ltda* 1: 219-238

Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, The Canadians Women's HIV Study Group. 2002. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol* 40: 902-907.

Coutlée F, Hankins C, Lapointe N, and the Canadian Women's HIV Study Group. 1997. Comparison between vaginal tampon and cervicovaginal lavage specimens collection for detection of human papillomavirus DNA by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 51: 42-47.

Crum CP. 2000. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. *Mod Pathol* 13: 243-251.

Cuzik J, Sasiene P, Davies P. 2000. A systematic review of the role of human papillomavirus (HPV) testing within a cervical screening program: summary and conclusions. *Br J Cancer* 83: 561-565.

Cuzik J. 2002. Role of HPV testing in clinical practice. *Virus Res* 89: 263-299.

Dalstein V, Reithmuller D. 2003. Persistence and load of high-risk HPV are predictions for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 106: 396-403.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, Van den Brule AJ, Meyir CJ and Sniyders PJ. 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76: 1057-1062.

de Sanjose S, Munoz N. 1994. Sexually transmitted agents and cervical neoplasia in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 56: 358-363.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324:17-27.

Dean AG, Dean JA, Burton AH. 2003. Epi-Info (software) Centers for Disease Control and Prevention, *World Health Organization*, Atlanta, Georgia.

Desaints C, Demeret C, Goyat S, Yaniu M, Thierry F. 1997. Expression of the papillomavirus E2 protein in Hela cells induce a apoptosis. *The Emb Journal* 16: 504-514.

Doorbar J and Sterling JC. 2001. The biology of human papillomaviruses In: Sterling JC and Tyring SK, editors. *Human papillomaviruses – Clinic and scientific advances*. *Arnold* 2: 10-23.

Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, and Wadell G. 1995. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 171: 1026-1030.

Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Brochu P, Simord P, Falconi S, Yotov WV. 2001. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec

by PCR direct sequencing approach. *J Med Virol* 63: 284-292.

Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR. 2001. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol* 64: 550-559.

Finzer P, Aguilar-Lemarroy A and Rose F. 2002. The role of papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett* 188: 15-24.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rosseau MC, Desy M, Rohan TE. 1999. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 180: 1415-1423.

Frega A, Stentella P. 2003. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. *Cancer Lett* 196: 127-134.

Gevelber MA, Biro FM. 1999. Adolescentes e doenças sexualmente transmissíveis. *Clin Pediatr Am Norte* 49: 751-772.

Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P. 2004. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 42: 3861-3864.

Gonzales SL, Stremlau M, He X, Brasile JR and Munger K. 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75: 7583-7591.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38: 357-361.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. 1998. Genotyping of 27 Human papillomavirus type by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, Reverse Line Blot Detection Method. *J Clin Microbiol* 36: 3020-3027.

Guimarães EBM, Souza TJ, Porto SBO. 1997. Comportamento sexual e conhecimento sobre doenças sexualmente transmissíveis em jovens universitários da UFG Goiânia-Goiás-Brasil. In: *VI International Conference on Maternal and Neonatal Health*. ABSTRACTS Campinas.

Harnish DG, Belland M, Scheid EE, and Rohan. 1999 Evaluation of human papillomavirus – consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 13: 9-21.

Herrero R, Hildestim A, Bratti C, Sherman ME, et al. 2000. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 92: 464-74.

Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawier P, Sherman ME, Kurman RJ, Manos MM. 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 169: 235-240.

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. 1998. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The Eng J Med* 338: 423-428.

Howley PM. 1989. Role of the human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res* 51: 5019-5022.

Hubbard RA. 2003. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 127: 940-945.

IARC. Working Group. Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation

of carcinogenic risks to humans. Vol. 64 Lyon: WHO, *It Ag Res Cancer*, 1995.

IARC: International Agency for Research on Cancer 2004. *World Health Organization*. <http://www.dep.iarc.fr>. Acesso em 28/08/2004.

INCA. Dados dos Registros de Base Populacional. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 28/08/2004.

Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, and Walboomers JM. 1995. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 33: 901-905.

Jacobs MV, Snijders PJF, van den Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer C and Walboomers JM. 1997. A general primer GP5+/GP6+ mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human Papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 35: 791-795

Jovanovic AS, Mclachlin CM, Shen L, Welch WR, Crum CP. 1995. Postmenopausal squamous atypia: a spectrum including "pseudo-koilocytosis". *Mod Pathol* 8: 408-412.

Kado S, Kawamata Y, Shino Y. 2001. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. *Gynecol Oncol* 81: 47-52.

Kay P, Meehan K, Williamson AL. 2002. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Met* 105: 159-170.

Kleter B, Jan Van Doorn L, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, Schegget JT, Lindeman J, Harmsel BT, Burger M, Quint W. 1999. Development and clinical

evaluation of a highly sensitive PCR- reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 37: 2508-2517.

Kornegay JR, Roger M, Davies PO, Shepard AP, Guerrero NA, Lloveras B, Evans D, and Coutlée F. 2003. International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. *J Clin Microbiol* 41: 1080-1086.

Koutsky L. 1997. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Medicine* 102: 3-8.

Laconi S, Greco M, Pellegrini – Bettoli P, Rais M, Laconi E, Pani P. 2001. One-step detection and genotyping of human papillomavirus in cervical samples by reverse hybridization. *Diagn Mol Pathol* 10: 200-2006.

Lappa S, Coleman MT, Moscicki AB. 1999. Managing sexually transmitted disease in adolescents. *Primary care* 25: 71-110.

Ley C, Bauer HM, Reingold A, Schiffman MH, Chambers JC, Tashiro CJ, Manos MM. 1991. Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst* 83: 997-1003.

Liaw KL, Glass AG, Manos MM, Greer CE, Scott DR, Sherman M, Rurk RD, Kurman RL, Wacholder S, Rush BB, Cadell DM, Lawer P, Tabor D and Schiffman M. 1999. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 91: 954-960.

Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ, Schiffman MH, Zhang TY, Hsieh CY, Greer CE, You SL, Huang TW, Wu TC. 1995. Human papillomavirus and cervical neoplasia: a case-control study in Taiwan. *Int J Cancer* 62: 565-571.

Lin CT, Tseng CJ, Lai CH, Hsueh S, Huang HJ, Law KS. 2000. High-risk HPV DNA detection by Hibrid Capture II an adjunctive test for midly abnormal cytologic smears in women \geq 50 years of age. *J Reprod Med* 45: 345-350.

Ludicke F, Stalberg A, Vassilakos P, Major AL, Campana A. 2001. High and intermediate risk human papillomavirus infection in sexually active adolescents females. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 14: 171-174.

Manos MM, Tiang Y, Wright DK, Lunis AJ, Broker TR, Wolsky SM. 1989. Use of polymerase chain amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell* 7: 209-214.

Martinez J, Smith R, Farmer M, Resau J, Alger L, Daniel R, Gupta J, Shah K, Naghashfar Z. 1988. High prevalence of genital tract papillomavirus infection in female adolescents. *Pediatrics* 82: 604-608.

Matos E, Loria D, Amestoy GM, Herrera L, Prince M, Moreno J, Krunfly C, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Munoz N, Herrero F. 2003. Prevalence of human papillomavirus infection among women in Concórdia, Argentina: A population-based study. *Sex Transm Dis* 30: 593-599.

Mc Glennen RC. 2000. Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* 20: 383-406.

Meyer T, Arndt R, Stockfleth E, Flammann HT, Wolf H, Reischl U. 1995. Strategy for typing human papillomaviruses by RFLP analysis of PCR products and subsequent hybridization with a generic probe. *Biotechniques* 19: 632-639.

Mitchell MF, Schottenfeld D, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R. 1999. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obst Gynecol* 91: 626-631.

Molano M, Posso H, Weiderpass E, van den Brule AJ, Ronderos M, Franceschi S,

Meijer CJ, Arslan A, Munoz N. 2002. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *Br J Cancer* 87: 324-333.

Monteiro LC. 1999. Conhecimento e crenças sobre doenças sexualmente transmissíveis/ AIDS e comportamento sexual em jovens de escolas públicas estaduais de Goiânia. Dissertação de mestrado em epidemiologia. 90p. Universidade Federal de Goiás.

Moscicki AB. 1999. Human papillomavirus infection in adolescents. *Pediatr Clin North Am* 46: 783-807.

Moscicki AB, Ellenberg JH, Vermund SH, Holland CA, Darragh T, Crowley-Nowick PA, Livin L, Wilson, CM. 2000. Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescents girls. *Arch Pediatr Adolesc Med* 154: 127-134.

Moscick AB, Hills N, Shiboski S. 2001. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA* 285: 2995-3002.

Moscicki AB, Palefsky J, Gonzales J, and Schoolnik GK. 1990. Human papillomavirus infection in sexually active adolescent females: prevalence and risk factors. *Pediatr Res* 28: 507-513.

Moscicki AB, Palefsky J, Gonzales J, Smith G, and Schoolnik GK. 1992. Colposcopic and histologic findings and human papillomavirus (HPV) DNA test variability in young women positive for HPV DNA. *J Infect Dis* 166: 951-957.

Moscicki AB, Shiboski S, Broering J. 1998. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescents and young women. *J Pediatr* 133: 277-284.

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM and Schlegel R. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjone S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-527.

Munoz N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19: 1-5.

Naud P, Matos JC, Hammes L e Vettorazzi J. 2000. Infecção pelo papilomavirus humano (HPV). *HCPA* 20: 138-142.

Nelson JH, Hawkins GA, Edlund K. 2000. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* 38: 688-695.

Nonnemacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzeti MC. 2002. Identificação do papilomavirus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Pub* 36: 1-9.

Perrons C, Kleter B, Jelley R, Jalal H, Quint W, Tedder R. 2002. Detection and genotyping of papillomavirus DNA by SPF 10 and MY09/11 primers in cervical cells taken from women attending a colposcopy clinic. *J Med Virol* 67: 246-252.

Petry KU, Menton M, van Loenen-Frosch F, Gomes CH, Holz B, Schopp B, Garbrecht-Buettner S, Davies P, Boehmer G, van den Akker E, Iftner T. 2003. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *BJC* 88: 1570-1577.

Poliseno L, Mariani L, Colecchi P, Piras A., Faccaro L and Rainaldi G. 2002. Bcl2 – negative MCF7 cells over express p53: implications for the cell cycle and sensitivity

to cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 50: 127-130.

Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJ, Ho GYF, Klein RS, and Burk RD. 1997. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 35: 1304-1310.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. 2003. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 181-184.

Rapp L, Chen JJ. 1998. The Papillomavirus E6 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378: 1-19.

Reid R, Lorincz AT. 1995. Human papillomavirus tests. *Boilliere's Clin Obst Gynecol* 9: 65-103.

Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kiihndel K, Liebert UG. 2004. PCR detection of human Papillomavirus of the mucosa: Comparison between MY09/11 and GP5+/GP6+ primer sets. *J Clin Virol* 30: 302-308.

Richardson H, Franco E, Pintos J, Bergeron J, Arella M, Tellier P. 1999. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal university students. *Sex. Transm. Disease* 27: 79-85.

Richardson H, Ketsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlée F, and Franco EL. 2003. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention*. 12: 485-490.

Richart RM, Masood S, Syrjanen KJ, Vassilakos P, Koufman RH, Meisels A, Olszewski WT, Sakamoto A, Stoler MH, Vooijs GP, Wilbur DC. 1998. Human papillomavirus. *Acta Cytologica* 42: 50-58.

Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE, Franco EL. 2003b. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 12: 1029-1037.

Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco EL. 2003a. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis* 30: 581-587.

Sanchez-Peres AN, Soriano S, Clarke AR, Gaston K. 1997. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2F induced apoptosis. *J Gen Virol* 78: 3009-3018.

Schiffman MH. 1992. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 84: 394-8.

Schiffman HM and Britton LA. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer*. 76: 1888-1901.

Schiffman HM, Castle PE. 2003. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* 127: 930-934.

Sellers JW, Mahony JB, Kaczorowski J, Lytwyn A, Bangura H, Chong S, Lorincz A, Dalby DM, Janjusevic V, Keller JL. 2000. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ* 163: 503-518.

Sherman ME, Lorincz AT. 2003. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 95: 46-52.

Shew ML, Fortenberry D, Miles P, and Amortegui AJ. 1994. Interval between menarche and first sexual intercourse, related to risk of human papillomavirus infection. *J Pediatr* 125: 661-666.

Snijders PJ, Van der Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, and Walboomers JM. 1990. The use of general primers in the polymerase chain

reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71: 173-181.

Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu SP, Chu TY. 2002. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet* 76: 41-47.

TarKowski TA, Koumans EH, Sawyer M, Pierce A, Black CM, Papp JR. 2004. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis* 189: 46-50.

Terry G, Ho L, Londesborough P, Cuzick J, Mielzynska-Lohnas I, and Lorincz A. 2001. Detection of high-risk HPV types by hybrid capture 2 test. *J Med Virol* 65: 155-162.

Tieben LM, ter Schegget J, Minnaar RP, Bouwes Bavinck J, Berkhout RJ, Vermeer BJ, Jebbink MF, and Smits HL. 1993. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* 42: 265-279

Ting Y, Manos MM. 1990. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. *San Diego: Academic Press*, 356-367.

Turek LP, Smith EM. 1997. Programação genética dos papilomavirus humanos genitais na infecção e no câncer. In: Lorinczy AT, Reid R. *HPV tradução Denise Omena Futura*, supervisão: Lilian Padran da Silveira. Rio de Janeiro, *Interlivros* 9: 147-163.

van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, and Snidjers PJF. 2002. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human Papillomavirus genotypes. *J*

Clin Microbiol 40: 779-787.

van der Graaf Y, Molijn A, Doornwaard H, Quint W, van Doorn LJ, van den Tweel J. 2002. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol* 156:158-164.

Venturoli S, Cricca M, Bonvicini F, Giosa F, Pulvirente FR, Galli C, Musiane M, and Zerbini M. 2002. Human papillomavirus DNA testing by PCR-ELISA and hybrid capture II from a single cytological specimen: concordance and correlation with cytological results. *J Clin Virol* 25: 177-185.

Vernon SD, Unger ER, Williams D. 2000. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting and hybrid capture. *J Clin Microbiol* 38: 651-655.

Villa LL. 1997. Human papillomaviruses and cancer cervical. *Adv. Cancer Res.* 71:321-341.

Walboomers JMX, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19.

Walboomers JMX, Meijer CJ. 1997. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 181: 253-254.

Wang SY, Lui WM, Wang TS, Chore HF, Choo KB. 1997. Typing of human papillomaviruses by reductional RFLP analysis of biotin-labeled PCR fragments. *Biotechniques* 23: 574-578.

Wang TS, Chan HF, Liu WM, Choo KB. 1999. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence-labeled PCR fragments. *J Med Virol* 59: 536-540.

Wheeler CM, Parmenter CA, Hunt WC, Becker TM, Greer CE, Hildesheim A and Manos MM. 1993. Determinants of genital human papillomavirus infection among cytologically normal women attending the University of New Mexico student health center. *Sex Transm Dis* 20: 286-289.

Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, and Koutsky LA. 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risks factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 157: 218-226.

Woodman CBJ, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357: 1831-1836.

World Health Organization (WHO). 1998. Manual on the prevention and control of common cancers. WHO Regional publications – westerns Pacific Series n° 20.

Wright TC, Cox JT, Massad LS. 2002. Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 287: 2120-2129.

Wright TC. 1995. Cervical disease in HIV-infected women: prevalence, pathogenesis, detection and treatment in intraepithelial neoplasia of the lower genital tract. Edited by D. Luesley, J. Jordan, R. M. Richart, New York, *Churchill Livingstone*, 263.

Zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Bioch Bioph Act* 1288: F55-F78.

Zur Hausen H. 2002. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.

ANEXOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)