

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA



**DETECÇÃO DE DNA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
URINA E SECREÇÃO CÉRVICO-VAGINAL DE GESTANTES**

Dissertação para obtenção do título de
mestre em Genética e Toxicologia
Aplicada

LAURA HELENA GERBER

ORIENTADORA: Dr^a Maria Lucia Rossetti

CANOAS

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao meu Senhor e meu Deus.

Agradeço imensamente o meu marido Roberto, por participar ativamente dessa longa caminhada, por sua compreensão, paciência e carinho.

Aos meus avós Vaniz e Osvaldo que sempre estiveram presente na minha vida e sempre torceram muito por mim.

Também com imensa gratidão agradeço aos meus pais Luiz e Vera e também ao Sr. Valdir e Sra. Marilene que na minha ausência cuidaram com muito carinho e zelo da minha amada filha Lauren.

As minhas colegas de trabalho e minha aluna Débora por participar desta pesquisa demonstrando-se sempre prestativas. As amigas que fiz em especial Cristiane, Léa, Roberta, Franciele e Vanessa.

As meninas do laboratório Suelen Angeli e Carla Rosana que trabalharam incessantemente para esta conquista

Ao meu Tio Paulo e Tia Rose que sempre me acolheram de braços abertos.

Não esquecendo também as pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, pois, sem elas este trabalho não seria possível.

Em especial a professora Dra. Maria Lúcia Rossetti, por acreditar em mim.

Foram muitas viagens, muito trabalho, estudo e por fim agradeço ao meu Anjo da Guarda por estar sempre junto a mim.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	4
RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	11
1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV.....	13
1.2.1. Organização, Expressão Gênica e Ciclo Fisiopatológico Viral.....	15
1.2.2. Manifestações Clínicas do HPV.....	19
1.2.3. Transmissão do HPV.....	22
1.2.3.1. Transmissão Perinatal.....	23
1.3 Epidemiologia das infecções por HPV em gestantes.....	27
1.4. TRATAMENTO DO HPV.....	28
1.4.1. Tratamento na Gestação.....	28
1.5. DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR HPV.....	30
1.5.1. MÉTODOS INDIRETOS.....	30
1.5.2. MÉTODOS DIRETOS.....	31
1.5.2.1. Southern Blotting.....	32
1.5.2.2. Dot Blot.....	32
1.5.2.3. Captura Híbrida (Digene).....	33
1.5.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1. POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO.....	37
4.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	37
4.4. TAMANHO AMOSTRAL.....	37
4.5. VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	38
4.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	38
4.7. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	38
4.7.1. Tamanho da Amostra Clínica.....	38
4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	39
4.9. ANÁLISE DOS DADOS.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
ACO	Anticoncepcional
AGUS	Atipia Glandular de Significado Indeterminado
ASCUS	Atipia Escamosa de Significado Indeterminado
ATP	Adenosina Trifosfato
CMV	Citomegalovírus
CP	Citopatológico
CT	<i>Chlamydia Tachomatis</i>
DNA	Àcido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleosídeo Trifosfato
DP	Desvio padrão
DST	Doença Sexualmente transmissível
E1 – E7	Regiões Precoces do Genoma Viral
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EIE	Enzimaimunoensaio
EV	Epidermodisplasia Verruciforme
FC	Fixação do complemento
FDA	Food and Drug Administration
Fg	Fentogramas
H	Horas
HGSIL(LIEAG)	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (lesão intraepitelial Escamosa Alto Grau)
HIS	Hibridização in situ
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	International Agency For Research on Câncer
IC	Intervalo de Confiança
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFD	Imunofluorescência Direta
INCA	Instituto Brasileiro do Câncer
L1/12	Proteínas Tardias que Compõem o Capsídeo Viral
LCR	Long Control Region (Região regulatória)
LGSIL (LIEBG)	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (Lesão Epitelial de Baixo Grau
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mAmp	Miliampere

Mg	Miligrama
MIF	Microimunofluorescência
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NAATS	Teste de amplificação de ácidos nucleicos
Ng	Nanogramas
NIC-I-II-III	Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I-II-III)
ORF	Open Reading Frame (Fase Aberta de leitura)
p53	Gene constitutivo do genoma humano Protetor à indução do Câncer
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato alcalino
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)
Pmol	Picomol
PRR	Papilomatose Respiratória Recorrente
pRB	Proteína do Retinoblastoma
RC	Razão de Chances
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA Ribossomal
TEB	Tris borato-EDTA
UV	Ultravioleta
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
x²	Teste do Qui- Quadrado

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS

Figuras da Dissertação

Figura 1. Representação do Capsídeo Viral (Münger <i>et al.</i> , (2004).....	16
Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV; genes precoces (E) Tardios (L) e região controladora (LCR) (Howley <i>et al.</i> , (1996).....	17
Figura 3. Verrugas genitais na região vulvar ocasionadas pela infecção viral.....	19
Figura 4. Comparação da Prevalência de DNA-HPV e a idade gestacional na urina e secreção vaginal.....	51

Tabelas da Dissertação

Tabela 1. Comparação da detecção de DNA-HPV em amostras de urina e secreção vaginal.....	42
Tabela 2. Distribuição das características sócio-demográficas da população em estudo.....	47
Tabela 3. Distribuição das variáveis estudadas de acordo com a presença de HPV nas amostras de urina e secreção vaginal.....	48

RESUMO

A infecção pelo HPV é considerada um dos problemas de saúde pública mais importante nos países em desenvolvimento. O principal risco da infecção pelo HPV no transcorrer da gestação é a possível contaminação do recém nascido durante a passagem pelo canal de parto, e um aumento da proliferação das lesões. Este estudo teve como objetivo realizar uma avaliação em urina de gestantes como material biológico para detecção de DNA de HPV para utilização em estudos de prevalência e diagnóstico quando comparado à detecção em lavado cérvico-vaginal. Trata-se de um estudo transversal, realizado com 139 gestantes que buscaram atendimento no Hospital Divina Providência, na cidade de Frederico Westphalen – RS, fornecendo uma amostra de urina e lavado cérvico vaginal para diagnóstico de DNA – HPV através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A análise dos resultados demonstrou que as 64 pacientes que tiveram amostra coletada para urina e lavado cérvico-vaginal, 39,0% (25/64) apresentaram positividade de DNA de HPV em ambos os materiais biológicos. Houve diferença significativa entre os dois métodos diagnósticos (urina versus lavado cérvico-vaginal) ($p < 0,001$), com uma sensibilidade de 72,0% (IC95%: 50,5%-87,9%) e especificidade de 82,0% (IC95%: 66,4%-92,5%) para a urina. A concordância encontrada entre os dois métodos foi de 82,0%, neste estudo. E analisando todos os resultados encontrados, podemos observar que a prevalência HPV na urina e secreção cérvico-vaginal de mulheres gestantes é alta e os resultados mostraram-se altamente concordantes. Por isso, amostras de urina podem ser utilizadas como meio de testes para a identificação do vírus HPV. Para gestantes, o diagnóstico de DNA de HPV em amostras de urina é um meio simples, confiável e não-invasivo.

ABSTRACT

The HPV infection is considered one of the most important public health in developing. The principal main risk of HPV infection during of pregnancy is the possible contamination of the recently born during the passage through the channel of delivery, and increased proliferation of injuries. This study aimed to conduct an assessment in urine of pregnant women as biological material for detection of HPV DNA for use in studies of prevalence and diagnosis when compared to detection in cervical-vaginal lavage. It is a cross-sectional study, conducted with 139 pregnant women who sought treatment at the Divine Providence Hospital in the city of Frederick Westphalen-RS, providing a urine sample of cervical and vaginal lavage for diagnosis of HPV- DNA by the technique of in Chain Reaction Polymerase chain reaction (PCR). In analyzing the results show that the 64 patients who had samples collected for urine and cervical-vaginal lavage, 39.0% (25/64) were positive for HPV-DNA in both biological materials. There were significant differences between the two diagnostic methods (urine versus cervical-vaginal lavage) ($p < 0001$), with a sensitivity of 72.0% (95% CI: 50.5% -87.9%) and specificity of 82.0 % (95% CI: 66.4% -92.5%) for urine. The correlation found between the two methods was 82.0% in this study. And considering all results, we can see that the prevalence HPV in cervical-vaginal washed urine of pregnant women is high and the results were highly consistent. Therefore, samples of urine can be used as a means of testing to identify the HPV virus. For pregnant women, the diagnosis of HPV DNA in urine samples is a simple, reliable and non-invasive.

1. INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são processos infecciosos causados por um grupo heterogêneo de agentes, agrupadas devido à significância epidemiológica do contato sexual, embora este não seja necessariamente o único meio de transmiti-las (Leonart *et al.*, 2004).

A infecção causada pelo Papilomavírus Humano (HPV) é a mais comum das viroses de transmissão sexual, sendo que a mesma transformou-se em um expressivo problema pela íntima relação com lesões genitais malignas e seus precursores (da Silva *et al.*, 2004).

Aproximadamente 140 tipos de HPV já foram identificados e cerca de um terço destes, estão associados a infecções genitais transmitidas sexualmente. A papilomavirose pode ocorrer em diferentes partes do organismo. Alguns tipos de HPV afetam mãos, joelhos, e pés, outros a face e ainda o trato genital. Nas formas clínicas dos diferentes papilomas ou condilomas, são característicos e vão de verrugas plantares e dolorosas, papilomas orais e laríngeos, condilomas acuminados planos e invertidos (da Silva *et al.*, 2004).

A correlação de certos tipos de HPV com tecidos epiteliais normais e lesões, ou tipos associados com carcinomas, tem levado à concepção de HPV de baixo e alto risco oncogênicos, pelo fato de que a cerca de 20 anos, o HPV foi identificado como agente causador e transmissor do câncer cervical (Madi *et al.*, 2003).

A infecção pelo HPV é considerada a causa principal dos casos de câncer cervical e de uma pequena fração dos casos de câncer vaginal, vulvar, peniano e anal. (Hoory *et al.*, 2008). Além do HPV, diversos estudos estão considerando a *Chlamydia trachomatis* como um possível co-fator no desenvolvimento de neoplasias intra-epiteliais cervicais (NICs) e outras alterações celulares significativas em mulheres com histórico de infecção por HPV. Epidemiologistas continuarão concentrando seus estudos em câncer cervical, devido à sua prevalência global e à disponibilidade de excelentes modelos epidemiológicos de carcinogênese (Tamim *et al.*, 2002).

O câncer cervical é um dos problemas de saúde pública mais importante nos países em desenvolvimento, com mais de 300.000 casos incidentes por ano em todo o mundo (Hernandez-Girón *et al.*, 2005; Sinal *et al.*, 2005). É considerado um dos tumores malignos mais frequentes na população brasileira, superado apenas pelo câncer de mama e de pele não-melanoma. Dados absolutos sobre incidência e mortalidade por câncer cervical, do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam para 2008, uma expectativa de 18.680 casos novos, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres (INCA 2008).

A Identificação precoce de HPV, bem como a sua caracterização é de grande importância no diagnóstico e acompanhamento dos casos considerados positivos, pois o HPV apresenta tipos oncogênicos relacionados com o câncer de colo uterino, como os tipos 16, 18 e 31 (Abel *et al.*, 2005). E os que são considerados baixo risco tais como, HPV -6, 11, 26, 42, 43, 44, 54, 70, e 73 (Okada *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2000).

Atualmente, é sabido que diversos fatores têm influenciado na carcinogênese relacionado com o HPV. Dentre estes, podemos citar características sócio-comportamentais como a idade da mulher, o uso de tabaco, a diversidade de parceiros sexuais, a frequência de infecções genitais, o uso continuado de anticoncepcivo oral e, principalmente, o número de gestações ao longo da vida (Morrison *et al.*, 1991; Syrjänen *et al.*, 2006; Salvatore *et al.*, 2006; Steben *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008).

Para Jacyntho *et al.* (1994) é importante o estudo do efeito da gravidez sobre a infecção pelo HPV. Há consenso da maioria dos autores de que durante a gravidez ocorra agravamento da infecção pré-existente, com aumento da proliferação das lesões, isto devido a um aumento da carga viral, de alterações hormonais e de metabolismo na gestante (Armbruster-Moraes *et al.*, 2000; Philip *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Frega *et al.*, 2007). A gestação, neste aspecto, favoreceria o desenvolvimento e a proliferação das lesões condilomatosas tornando mais difícil seu tratamento pelas constantes recidivas. O principal risco de infecção pelo HPV no transcorrer da gestação é a possível contaminação do recém nascido durante sua passagem pelo canal de parto (Sinal *et al.*, 2005). Tal contaminação atinge, principalmente, a árvore respiratória do recém nascido. Uma outra complicação está no desenvolvimento de lesões papilomatosas na região anogenital e conjuntival após o nascimento. Embora, um dos mecanismos clássicos da contaminação

dos recém-nascidos sejam pela passagem através do canal de parto, outros modos intra-úteros têm sido citados (Syrjänen *et al.*, 2000; Sinal *et al.*, 2005).

Um pequeno número de pesquisas tem avaliado a prevalência da infecção por HPV em mulheres grávidas e não-grávidas (Morrison *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2000; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Ruffin *et al.*, 2006). Apesar de ter sido encontrado uma alta prevalência de infecção nas gestantes, este dado ainda necessita de mais estudos para ser corroborado com outros achados. Poucos estudos foram encontrados evidenciando a positividade para DNA de HPV em líquido amniótico (Gopalkrishna *et al.*, 1995; Eppel *et al.*, 2000; Hernández-Girón *et al.*, 2005).

Atualmente, com os avanços biotecnológicos, é possível a detecção do vírus HPV e o diagnóstico precoce da infecção através de métodos moleculares que apresentam uma alta sensibilidade e especificidade, incluindo técnicas de hibridização líquida (Captura Híbrida[®] Digene), hibridização com sondas específicas (Southern Blotting) e reação em cadeia da polimerase (PCR). O exame Papanicolaou, conhecido como o preventivo do câncer de colo uterino ou citopatológico, é considerado um método simples, de baixo custo e eficaz, porém, é caracterizado por ser um método invasivo para gestantes e que deve ser realizado com muito cuidado. Desta forma, estudos vêm aprimorando técnicas de detecção em fluidos corporais, como a urina e o sangue, de maneira a facilitar a coleta e oferecer conforto à mulher gestante (Prusty *et al.*, 2005; Daponte *et al.*, 2006; Payan *et al.*, 2007; Jong *et al.*, 2008).

Assim, novos métodos diagnósticos estão sendo desenvolvidos, com o intuito maior de detectar precocemente este patógeno, com a perspectiva de uma atuação mais ampla em nível da prevenção primária ou evitar a infecção na gestação.

1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Atualmente, são conhecidos mais de 230 tipos virais que atingem a população em geral e, também outros vertebrados, como por exemplo, cães, gatos, coelhos, papagaios e ruminantes (Janicek *et al.*, 2001; Sinal *et al.*, 2005). Os papilomavírus pertencem à família

Papillomaviridae e podem ser classificados em tipos cutâneos ou mucosos. Entre os tipos cutâneos destacam-se os HPV-5 e HPV-8, sendo considerados de alto risco, pois estes estão intimamente relacionados com a epidermodisplasia verruciforme (EV), uma rara situação em que a pele sofre alterações ulcerosas, oportunizando a infecção pelo vírus, podendo ocasionar oncogênese humana (Janicek e Averette, 2001).

O HPV é classificado de acordo com seu potencial oncogênico e pela variabilidade na seqüência do gene L1 (2,0% a 10,0%) e apresentam diferentes tipos tais como, HPV-6, 11, 26, 42, 43, 44, 54, 70 e 73 que são considerados de baixo risco e os tipos HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 considerados de alto risco (Okada *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2000).

O HPV de baixo risco está relacionado, na maioria dos casos, com tumores benignos, lesões cutâneas leves e lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (SIL), também chamadas de lesões do tipo Neoplasias Intraepiteliais Cervicais de Grau I (NIC I) e *condiloma acuminatum*. O vírus de alto risco está relacionado com Neoplasia Intraepitelial Cervical de Grau II e III (NICs II e III) que podem progredir para carcinomas anogenitais e de colo uterino (Campion *et al.*, 1996; Sinal., 2005).

Os tipos HPV-16 e 18 são os mais prevalentes e ocorrem em 70,0% dos casos de câncer cervical (Hoory *et al.*, 2008). O HPV-16 é descrito como o de maior prevalência, seguido pelo HPV-18 e HPV-31, sendo que em algumas regiões, esta ordem de prevalência pode se modificar devido a características sócio-comportamentais e demográficas da população. Os tipos HPV-18, -16 e -31 estão relacionados ao câncer vulvar, peniano, carcinoma anal e carcinoma invasivo cervical, sendo que os tipos -16 e -18 progridem mais rapidamente para o NIC III do que qualquer outro tipo viral (Hoory *et al.*, 2008). Nos casos de câncer orais, mais de 20,0% dos pacientes apresentavam pelo menos um tipo de HPV de alto risco (Gillison *et al.*, 2000).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR HPV

As infecções por HPV vêm aumentando de maneira significativa no mundo ocidental, sendo a infecção condilomatosa do colo uterino, as causas mais frequentes de alterações citológicas encontradas no exame preventivo. Estima-se que lesões por HPV representem 50,0% das atipias cervicais encontradas nos esfregaços sistemáticos (Campos *et al.*, 2004).

Aproximadamente, 20 milhões de pessoas estão atualmente infectadas pelo HPV no mundo. Alguns autores estimam que, entre 50 a 80,0% dos homens e mulheres sexualmente ativos adquirem a infecção genital por algum tipo de HPV e que, entre estes, 5,0% a 10,0% tornam-se infecções persistentes com tipos oncogênicos de HPV que podem progredir para o câncer cervical (Koutsky, 1997; Perez, 2001; Hernández-Girón *et al.*, 2005; Schiffman *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008).

As infecções pelo HPV são muito comuns na maioria das populações estudadas em todo o mundo, incluindo o Brasil. Elas podem afetar de 10 a 40,0% das mulheres sexualmente ativas, principalmente, as mais jovens. A maioria destas infecções é transitória, podendo ser eliminadas espontaneamente. Entretanto, uma pequena proporção de mulheres infectadas apresenta infecção persistente, em geral com HPV de alto risco. Há evidências recentes associando a persistência da infecção por HPV com o elevado número de cópias virais, ao risco maior para o desenvolvimento das neoplasias cervicais. No entanto, apenas uma minoria de mulheres infectadas por HPV, eventualmente desenvolverá o câncer do colo do útero (Trottier *et al.*, 2006).

A cada ano, 500.000 novos casos de câncer cervical são diagnosticados em todo o mundo e, 50,0% das mulheres com o diagnóstico da doença eventualmente morrem devido à mesma (Gross & Barrasco, 1999; INCA, 2008; Hoory *et al.*, 2008).

Estima-se que 10 a 20,0% das mulheres estejam infectadas de forma latente pelo HPV. Em mulheres grávidas, pesquisadas por PCR, o vírus de HPV foi detectado em mais de 50,0% destas (da Silva *et al.*, 2004). Pelo método de Captura Híbrida II (Digene), Hernández-Girón *et al.* (2005), encontraram uma prevalência de 37,1% de HPV em mulheres gestantes.

Segundo Fonseca *et al.* (1998) e da Silva *et al.* (2004), a incidência de HPV na população em geral é de 1,0 a 8,0%. Acredita-se que num período de 10 anos, mais da metade das mulheres com vida sexual ativa adquire, ao menos, uma infecção por HPV. A infecção por HPV é mais freqüente em jovens, estando o pico na faixa etária de 20 a 24 anos. Entretanto, outros estudos realizados com mulheres acima de 50 anos, com alterações citopáticas de infecção por HPV, mostraram padrões similares aos de outras idades.

As infecções por HPV costumam acometer a população em geral, num percentual de 20,0% a 46,0% em mulheres jovens em vários países. Estudos indicam que 50,0% das mulheres contraem HPV antes de completar 2 anos do início de sua vida sexual. (Tábora *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de câncer cervical invasivo em mulheres infectadas por HPV ocorre em pequenas proporções, porém, há outros cofatores que podem agravar o quadro, como associações com outras DSTs, hormônios, deficiências nutricionais ou respostas genéticas e imunológicas diferenciadas (Smith *et al.*, 2002).

Na Alemanha, a prevalência de infecções por HPV-16 em gestantes teve um acréscimo de 16,0% para 21,0% entre 1969 e 1980 (af Geijerstam *et al.*, 1998).

Hagensee *et al.* (1999), em seu trabalho em Nova Orleans, entre 1984 a 1989, com 2597 amostras de soro de gestantes atendidas pelo estudo sobre prematuridade e infecção genital, encontraram uma prevalência de 28,0% de infecção por HPV-16.

Nos Estados Unidos, na década de 30, o câncer cervical foi a maior causa de morte por câncer. O teste de *Papanicolaou* (CP) e outros testes de rastreamento para HPV colaboraram para o diagnóstico precoce da infecção. Assim, a taxa de mortalidade por câncer cervical diminuiu muito no século XX (Janicek e Averette, 2001).

A prevalência de infecções por HPV de alto risco em uma população dos Estados Unidos, com idade de 25 anos foi de 27,4%. Entretanto, um outro estudo na Escócia com mulheres de idade de 36 anos demonstrou uma prevalência de aproximadamente 20,5% para todos os tipos de HPV e, de 15,7% para HPV de alto de risco (Kulasingam *et al.*, 2002).

Laukkanen *et al.* (2003) demonstraram que a infecção por HPV-16, entre o período de 1983 a 1985, em mulheres com menos de 23 anos de idade, decresceu de 25 pessoas para 13 a cada 1000 pessoas por ano. Entretanto, entre os anos de 1995 e 1997, a taxa de infecção aumentou de 13 pessoas para 31 entre 1000 pessoas por ano.

Nowak *et al.* (2007), entre 2005 e 2006, em uma clínica de gravidez de alto risco, desenvolveu um estudo com 400 gestantes, sendo 180 no segundo trimestre de gestação e 220 no terceiro trimestre. Foi encontrada uma prevalência por HPV de 4,5%, 2,5% de HPV-16 e 1,7% de HPV-18 respectivamente. A co-infecção por 16 e 18 foi de 0,2%. Nas 180 gestantes do segundo trimestre de gestação, a prevalência foi de 4,4%, sendo de 2,8% para HPV-16 e 1,7% para HPV-18. No terceiro trimestre, 2,3% foi de HPV-16, 1,8% de HPV-18 e co-infecção de 0,4%. Infecção por HPV de baixo risco (HPV-6) foi de 1,0%, sendo 1,1% no segundo trimestre e 0,9% no terceiro trimestre.

No mundo inteiro, apenas o câncer de mama supera a incidência e a mortalidade do câncer cervical, sendo que este é a sétima causa de mortalidade na população mundial. Já nos países subdesenvolvidos, o câncer cervical é a maior causa de morte entre mulheres em idade reprodutiva (Genest *et al.*, 1993; Janicek e Averette, 2001).

1.2.1. Organização, Expressão Gênica e Ciclo Fisiopatológico Viral

O vírus do HPV apresenta um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros e 55 nm de diâmetro, onde se encontra o DNA de dupla fita, em disposição circular com aproximadamente 8 kb e que codifica um total de 10 proteínas (Sinal *et al.*, 2005; Dunne *et al.*, 2006). O genoma viral consiste de vários genes e sua organização pode ser dividida em três regiões principais.

1) Região Reguladora Não-Codificadora: região que contém seqüências que controlam a transcrição através da RNA polimerase e está localizada ao lado da região codificadora inicial (Scheurer *et al.*, 2005);

2) Região Codificadora Inicial (*Early Region*): região que contém vários dos genes envolvidos na replicação viral que são expressos imediatamente após a infecção da célula hospedeira pelo vírus;

3) Região Codificadora Tardia (*Late Region*): região que contém os genes que serão expressos tardiamente após a infecção viral e está dividida em duas estruturas de leitura aberta (*open reading frame* - ORF): L1 - porção maior da região codificadora tardia, responsável pela formação da cápside viral e; L2 - porção menor da região codificadora tardia, responsável pelo empacotamento do DNA viral com os outros produtos dos genes. A expressão dos genes da região codificadora inicial controla a replicação, transcrição e transformação celular do DNA viral e adicionalmente apresenta um papel na proliferação celular não controlada (Howley, 1996; Münger *et al.*, 2004; Scheurer *et al.*, 2005) (Figura 1).



Figura 1. Representação do capsídeo viral de HPV. O vírus do HPV apresenta um capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros, onde se encontra o DNA de dupla fita, em disposição circular, e 55 nm de diâmetro (Münger *et al.*, 2004)

(<http://jornalmourinho.files.wordpress.com/2008/04/hpv1.jpg>)(<http://www.korona.ro/ginecologie-obstetrica/poze/articole/38a95e590bae9593866a6d5a85cd0c68.jpg>)

O genoma viral apresenta complexos de proteínas funcionais (proteínas precoces) codificados pelos genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7* associados com o controle da replicação e transcrição virais (não integrado ao genoma hospedeiro) e duas proteínas tardias, que

fazem parte do capsídeo, codificadas pelos genes *L1* e *L2* (Howley, 1996; Scheurer *et al.*, 2005) (Figura 2).

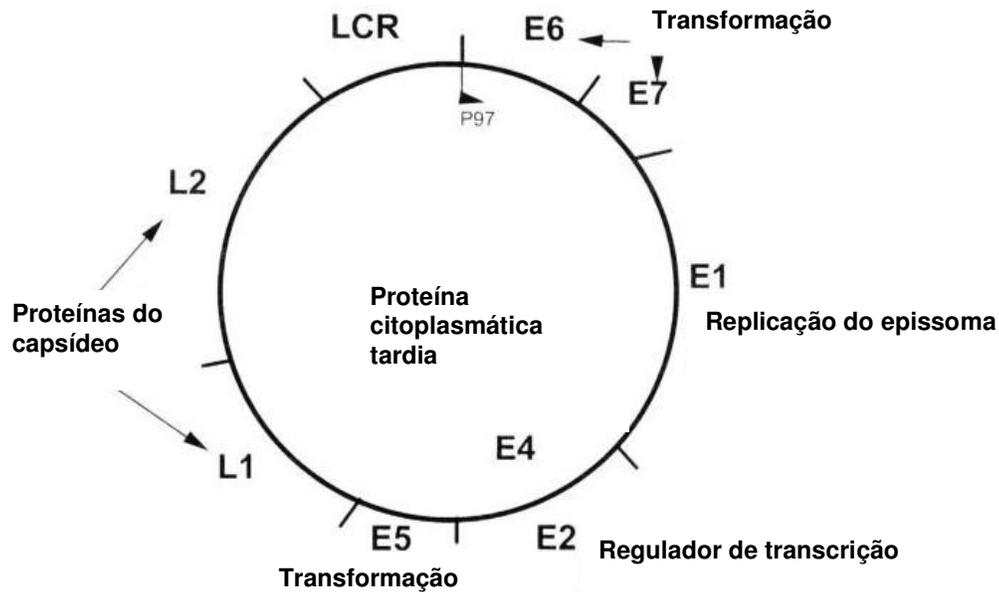


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV: genes precoces (E), tardios (L) e região controladora (LCR) (Howley *et al.*, 1996).

Os genes E6 e E7 codificam, além dos produtos para a replicação viral, onco-proteínas que têm um papel fundamental na imortalização e transformação da célula hospedeira. As proteínas virais E6 e E7, produzidas pelo HPV de tipos de risco elevado, são críticas para a transformação maligna devido à sua capacidade de se ligar e inativar as proteínas celulares codificadas pelos genes supressores tumorais como o p53. A capacidade de ligação destas proteínas produzidas pelo HPV dos tipos de risco elevado é muito maior do que a observada para aqueles de tipos de risco baixo (Münger *et al.*, 1994; Scheurer *et al.*, 2005).

A função da proteína p53 é preservar a integridade do genoma celular, através do controle da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular durante a qual ocorre a replicação do DNA e da apoptose celular (Ullrich *et al.*, 1992). A onco-proteína E6 inativa a proteína p53. Assim, as células que expressam esta onco-proteína demonstram uma

instabilidade cromossômica, progressão aberrante do ciclo celular e resistência à apoptose, além de alterações que aumentam de maneira dramática a probabilidade de transformação maligna das células infectadas pelo HPV. Adicionalmente, a interação da onco-proteína E6 com outras proteínas da célula hospedeira, que estão envolvidas na expressão gênica transcricional, na adesividade celular, transdução, supressão tumoral e regulação da telomerase, contribui para a imortalização celular e progressão tumoral (Altiok 2003).

O HPV é um organismo intracelular obrigatório, infectando células em fase mitótica ativa, que se estabelece no epitélio. Após a infecção, inicia o ciclo viral, coordenado por fatores que regulam a resposta imunológica do hospedeiro (Münger *et al.*, 2004).

Há estudos que demonstram relações importantes entre as proteínas virais E1 e E2 e a formação de tumores (Janicek e Averette *et al.*, 2001; Münger *et al.*, 2004).

O vírus penetra inicialmente nas células da camada basal do epitélio e sofre a maturação à medida que progride através das camadas para-basal, espinhosa e granular. Uma vez presente na camada granular do epitélio, observa-se a replicação do DNA viral, a síntese das proteínas tardias e, finalmente, a formação das partículas virais (Perez, 2001; Carvalho e Oyakawa, 2000) (Figura 3).

Após a exposição ao HPV, a infecção aguda com replicação viral pode apresentar-se sob a forma de quatro diferentes tipos de manifestação:

1) Infecção Transitória - na qual há a eliminação do genoma do HPV, através dos processos de apoptose, e a maioria das mulheres fica livre do vírus;

2) Infecção Clínica - na quais partículas virais intactas são formadas através de replicação vegetativa do genoma do HPV e se manifesta através da proliferação das células do epitélio escamoso, o que determina a formação de tumores benignos (verrugas genitais e condiloma). As células basais próximas às infectadas também são infectadas e formam-se colônias em sobreposição, com aparência de uma verruga em forma de couve-flor. As verrugas nas mãos e nos pés apresentam um período de incubação de 6 a 8 meses, e as verrugas genitais apresentam um período de incubação de 2 a 6 meses (Carvalho e Oyakawa, 2000) (Figura 3).



Figura 3. Verrugas genitais na região vulvar ocasionadas pela infecção viral.

(<http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/condiloma-acuminado/imagens/condiloma-16.jpg>)

3) Infecção Latente - na qual o genoma do HPV é estabilizado como um episossoma (DNA não integrado) e permanece na célula hospedeira sem causar qualquer alteração clínica ou morfológica do epitélio escamoso, sendo evidenciada apenas através das técnicas de detecção do DNA viral.

4) Infecção Persistente - na qual o genoma do HPV sofre replicação e expressão e pode ser integrado ao genoma do hospedeiro. A integração viral resulta na perda do controle que as onco-proteínas ou os supressores tumorais críticos exercem sobre a proliferação celular determinando o desenvolvimento de lesões cancerosas (Dunne *et al.*, 2006; Hoory *et al.*, 2008).

1.2.2. Manifestações Clínicas do HPV

O HPV é encontrado em 95,0% dos casos de câncer cervical (Zür Hausen, 1994). A infecção no colo uterino e nos genitais masculinos é a mais freqüente na forma subclínica, podendo estar associada à neoplasia intra-epitelial e diagnosticada pelo uso de colposcopia após aplicação de ácido acético a 5,0%.

O período de incubação da doença varia de um mês a 2 anos e as manifestações

clínicas (por exemplo, verrugas genitais) ocorrem em média cerca de dois a quatro meses após a exposição ao vírus (Sweet *et al.*, 2002).

Pouco é conhecido sobre o período de latência ou persistência desses vírus no organismo. Algumas lesões associadas ao HPV, entretanto, progredem para neoplasias de diferentes graus (Warford *et al.*, 2003). No colo do útero, é reconhecido que neoplasias cervicais associadas a certos tipos de HPV podem evoluir para carcinomas, podendo o curso de a doença demorar um número variável de anos. Na mulher, as lesões mais comuns ocorrem na vulva, períneo, região perianal, vagina e colo; e no homem, na glândula, sulco bálano-prepucial e região perianal (Warford *et al.*, 2003).

Na infecção clinicamente evidente, as verrugas genitais encontram-se localizadas com frequência na genitália externa e na região perineal e podem ser agrupadas em quatro tipos morfológicos distintos:

- a) Condiloma acuminado, com forma semelhante à "couve-flor";
- b) Verruga papular lisa, com forma arredondada, geralmente da cor da pele e com cerca de 1 a 4 mm de diâmetro;
- c) Verruga genital queratótica, com uma camada cornificada e espessa (semelhante à verruga vulgar ou à queratose seborréica);
- d) Verruga plana, representada por uma pápula com superfície achatada, com bordas planas ou levemente elevada (Gross e Barrasco, 1999).

As verrugas genitais exofíticas (condiloma acuminado) surgem como tumores sésseis rosados, esbranquiçados ou pigmentados com projeções lobuladas ou digitiformes em sua superfície e se manifestam inicialmente na região da fúrcula, vestíbulo e lábios vaginais, podendo espalhar-se para as regiões adjacentes da vulva, regiões crurais e terço superior das coxas. Em cerca de 20,0% dos casos, o condiloma acuminado aparece também no períneo e na região peri-anal. As lesões vaginais podem ser observadas em cerca de um terço das pacientes com lesões vulvares, mas raramente são extensas (Sweet *et al.*, 2002).

No colo uterino, as lesões que ocorrem são em geral condilomas planos e endofíticos sendo usualmente detectados apenas através da colposcopia. As pacientes procuram o atendimento médico devido ao aparecimento de lesões em sua região genital e raramente têm outras queixas, tais como prurido, ardência local, dor ou mesmo sangramento. A queixa de corrimento vaginal é freqüente nestas pacientes, provavelmente devido a uma infecção vaginal coexistente e não decorrente da infecção pelo HPV. Queixas urinárias tais como hematúria terminal ou jato urinário anormal podem ocorrer, devendo-se desta forma realizar a inspeção visual da uretra distal e meato uretral (Sweet *et al.*, 2002).

A maioria das infecções genitais pelo HPV é assintomática, porém, na gestação, as lesões condilomatosas aumentam rapidamente em número e tamanho, irradiando-se para as regiões adjacentes da vulva e para o terço superior das coxas, e se tornam friáveis e hemorrágicas de maneira típica. Estas lesões podem causar desconforto e dificuldade importantes na micção e evacuação, obstrução do canal de parto (raramente) e hemorragia associada ao parto vaginal (Schwartz *et al.* 1988) O crescimento rápido destas lesões, associado ao aumento pronunciado da vascularização local, observado na gestação, resulta provavelmente da interação de três fatores importantes:

- 1) Alterações locais, como a mucorréia observada ao longo do ciclo gravídico, a qual oferece condições de umidade ideais para o crescimento viral na região genital;

- 2) Alteração do ambiente hormonal, no qual o aumento importante das concentrações séricas de estrógeno e de progesterona pode promover o crescimento das lesões induzidas pelo HPV;

- 3) Estado imunossupressivo gestacional, o qual por um lado determina uma redução da capacidade de eliminação e por outro favorece a replicação viral (Eppel *et al.*, 2000).

O resultante aumento da replicação viral associado à evolução da gestação explicaria o crescimento das lesões vulvares e perineais, à maior taxa de detecção do DNA viral no colo uterino e, em certos casos, à progressão de lesões intra-epiteliais para a neoplasia cervical. Contudo, nem todos os pesquisadores encontraram tais associações com a gestação (Fife *et al.*, 1996; Armbruster-Moraes *et al.*, 2000).

Por outro lado, as lesões genitais regridem rapidamente ou desaparecem completamente no período puerperal, provavelmente devido à redução da vascularização e da umidade local ou mesmo devido ao retorno do sistema imunológico ao seu estado pré-gestacional (Chan *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003).

Com relação à papilomatose respiratória recorrente (PRR), na infância, a doença caracteriza-se por causar rouquidão, alterações da voz, tosse crônica, infecções respiratórias recorrentes e crescimento inadequado. Os maiores desafios para a abordagem terapêutica da PRR são representados pelo rápido crescimento e elevado índice de recorrência das lesões e, embora a doença seja usualmente resistente à maioria das terapias atualmente disponíveis, a remoção cirúrgica consiste em seu tratamento primário (Derkey, 1995).

Em casos de grau moderado e grave, a excisão endoscópica pode ser necessária com uma frequência de até 20 vezes ao ano apenas para manter as vias aéreas patentes. A traqueostomia é realizada em cerca de 14,0% dos casos na infância, para evitar o risco de vida que uma obstrução completa das vias aéreas determina (Derkey, 1995). Os casos de óbito associados à PRR são raros (Balazic *et al.*, 1997).

1.2.3. Transmissão do HPV

A transmissão do HPV pode ocorrer por contato sexual, não-sexual e materno-fetal. Geralmente, a transmissão sexual apresenta maior risco. O sexo oral também pode levar à transmissão do vírus e a lesões e, a auto-inoculação e transmissão através de objetos de uso diário também podem ocorrer (Gross e Barrasco; 1999; Perez, 2001). Também é possível a transmissão não-sexual através de fomites, como coçaduras, toalhas e roupas íntimas, ocasionando lesões verrucosas comuns na pele. Neste caso, por se tratar de uma infecção de curta duração, mulheres e crianças sem atividade sexual são as mais susceptíveis a este tipo de contaminação (Gross e Barrasso, 1999).

A transmissão materno-fetal pode ocorrer através do canal do parto. Durante a gestação, a mulher infectada pode estar com o sistema imunológico deprimido, desenvolvendo assim, lesões acentuadas, de difícil tratamento. A presença de HPV pode

prejudicar o recém-nascido pelo aparecimento de papilomatose juvenil da laringe. A manipulação das crianças pela mãe com lesões verrucosas também pode levar ao aparecimento destas lesões (heterocontaminação) (Gross e Barrasso, 1999).

1.2.3.1. Transmissão Perinatal

A Papilomatose respiratória recorrente (PRR) apresenta uma distribuição etária bimodal que inclui a forma juvenil (PRR-J), cujos sintomas iniciam-se logo após o parto, durante a infância ou em idade pré-escolar, e a forma adulta (PRR-A), com pico de incidência durante a terceira e quarta décadas de vida. Na forma juvenil, a instalação da doença clínica é altamente variável, com cerca de 25,0% dos casos manifestando-se no primeiro ano de vida e, até os três anos de idade, apenas 50,0% dos casos irão se manifestar clinicamente (Sweet *et al.*, 2002). O risco de transformação maligna da PRR é inferior a 5,0% e de disseminação extra-laríngea de cerca de 30,0% (Derkay 1995; Silverberg *et al.*, 2003).

A via de transmissão da PRR ainda não é completamente compreendida. As vias potenciais incluem a trans-placentária, intra-parto no canal vaginal ou pós-natal (Watts *et al.*, 1998; Tenti *et al.*, 1999).

Apesar da infecção genital materna pelo HPV ser comum, a forma juvenil da PRR é relativamente rara, de modo que apenas uma pequena proporção das crianças nascidas de mães infectadas desenvolverá o papiloma respiratório (Shah *et al.*, 1986; Sweet *et al.*, 2002). O risco estimado de transmissão neonatal do HPV varia de 1/100 a 1/1000 exposições (Sweet *et al.*, 2002).

Vários estudos sugerem que a infecção pelo HPV possa ser transmitida ao feto no útero. Shah *et al.* (1986) relataram um caso de papilomatose laríngea que se desenvolveu no primeiro ano de vida de uma criança nascida após uma cesárea eletiva. Segundo Sedlacek *et al.* (1989), Armbruster-Moraes *et al.* (1994) e Eppel *et al.* (2000), o HPV pode ser detectado no líquido amniótico de gestantes com lesões cervicais. Já Tseng *et al.* (1992) relataram a infecção pelo HPV em células mononucleares maternas e no sangue do cordão

umbilical de seus recém-nascidos, indicando que o vírus pode cruzar a barreira placentária e infectar o feto dentro do útero.

Contudo, a via pela qual o HPV poderia infectar os fluidos fetais, tais como líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical, ainda é desconhecida. Um processo de disseminação local entre vulva, colo uterino e líquido amniótico poderia ser outra possibilidade (Armbruster-Moraes *et al.*, 1994). Na gestação, a cavidade uterina sofre várias alterações fisiológicas que podem permitir que as partículas virais atinjam o líquido amniótico de maneira mais fácil (Eppel *et al.*, 2000). A infecção de oócitos secundários ou embriões pelo HPV antes ou imediatamente após a sua implantação e a infecção através de espermatozoides contaminados por este vírus também já foram descritas (Chan *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2002).

Segundo Sedlacek *et al* (1989), Pakarian *et al* (1994) e Smith *et al* (2004), a taxa de detecção de HPV nas primeiras 24 a 48 horas de vida entre os recém-nascidos cujas mães tiveram resultado positivo ou negativo durante a gestação variou de 4,0% a 72,0% e de 0,6% a 20,0%, respectivamente. Estudos similares, realizados em crianças com seis semanas de vida demonstraram não somente que as taxas de detecção do vírus eram variáveis, mas também que estas taxas nem sempre foram significativamente diferentes quando crianças nascidas de gestantes com resultado positivo ou negativo para o vírus eram comparadas (Cason *et al.*, 1995; Pakarian *et al.*, 1994).

Cason *et al.* (1995) encontraram uma taxa de transmissão vertical de cerca de 70,0% em um grupo de gestantes selecionadas com base na elevada prevalência da infecção pelo HPV (presença de verrugas genitais e antecedentes de alterações da colpocitologia oncótica).

Puranen *et al.* (1997) reportaram uma taxa maior de detecção do vírus (cerca de 80,0%), utilizando a técnica de PCR seguida pela hibridização por *Southern blot*. Neste estudo, a taxa de detecção do DNA de HPV no material aspirado da nasofaringe de crianças nascidas de gestantes, sem sinais clínicos de infecção pelo HPV, foi de 37,0% e o grau de concordância entre o mesmo tipo de HPV encontrado na mãe e no recém-nascido foi de 69,0%.

Tseng *et al.* (1998) avaliaram 301 gestantes e seus recém-nascidos para a presença do HPV dos tipos 16 e 18, considerando separadamente a via de parto (vaginal: 160 casos; cesárea: 141 casos). A frequência do HPV dos tipos 16 ou 18 foi de 22,6% e sua taxa de transmissão no nascimento foi de cerca de 40,0%. Uma taxa significativamente maior ($p=0,04$) de detecção da infecção pelo HPV dos tipos 16 ou 18 foi verificada entre os recém-nascidos de parto normal (51,4%) quando comparados aqueles nascidos de cesárea (27,3%).

Por outro lado, Watts *et al.* (1998) acompanharam 151 gestantes que tiveram recém-nascidos vivos e que foram avaliadas para a presença do HPV através de exame clínico, colposcópico e teste de PCR, antes da 20ª semana e entre a 34ª e 36ª semana da gestação. Os exames para a detecção de DNA de HPV foram realizados em amostras da boca, genitália externa e ânus das crianças no nascimento, seis semanas após e em intervalos semestrais a partir de seis até 36 meses de vida. Durante a gestação, 112 (74,0%) das 151 gestantes apresentavam evidências clínicas e/ou laboratoriais da presença de HPV. Entre as crianças, o HPV foi detectado em apenas três (4,0%) de 80 crianças e em 5 (8,0%) de 63 crianças nascidas de gestantes com resultado positivo ou negativo para o DNA de HPV entre a 34ª e 36ª semana de gestação, respectivamente. Neste estudo, a taxa de transmissão perinatal de mulheres com evidências clínicas e/ou laboratoriais de infecção genital pelo HPV foi de 2,8%.

De maneira similar, Tenti *et al.* (1999) observaram que gestantes assintomáticas e sem alterações da colpocitologia oncótica ou antecedentes de verrugas genitais, portadoras da forma latente da infecção pelo HPV, apresentavam um baixo potencial de transmissão de vírus à mucosa da orofaringe dos recém-nascidos. Este estudo incluiu 711 pares de gestantes e recém-nascidos, dos quais 37 (5,2%) gestantes apresentaram um resultado positivo para o HPV e, destas nove (1,3%) foram positivas para o DNA dos tipos oncogênicos 16 e 18. O DNA de HPV foi detectado em 11 crianças nascidas por parto vaginal, indicando uma taxa de transmissão vertical de 30,0%.

Estes autores observaram que o intervalo entre as contrações e o nascimento parece ser um fator crítico para a previsão da transmissão do vírus. Nos casos nos quais a ruptura ocorreu em um intervalo inferior a duas horas, todos os recém-nascidos testados foram

negativos para o HPV, enquanto aqueles que nasceram em um intervalo de 2 a 4 horas ou superior, apresentaram uma taxa de positividade para o vírus de 33,0% e 80,0%, respectivamente ($p=0.001$).

Em um estudo recente, Silverberg *et al* (2003), avaliaram de maneira longitudinal casos de papilomatose laríngea recorrente juvenil. Foram analisados cerca de 11.000 nascimentos com (3.033) e sem (7.902) PRR. Como resultado do estudo, os pesquisadores observaram que um contato aumentado entre a gestante e o feto (maior do que 10 horas, medido pela duração do trabalho de parto), dobra o risco de papilomatose respiratória, reforçando a hipótese de transmissão intra-parto do HPV. Os autores observaram que o antecedente materno de verruga genital durante a gestação confere um risco 231 vezes maior para o desenvolvimento de papilomatose respiratória quando comparado ao de gestantes sem este antecedente.

Contudo, a falta de evidências de um efeito protetor da cesárea, bem como a falta de associação com complicações como o parto operatório, indicam que a transmissão no útero e pós-natal podem ser mais comuns do que previamente suspeitado. Adicionalmente à duração do intervalo entre o trabalho de parto e o momento do nascimento, demonstrou-se que a carga viral nas células cervicais ou vaginais representa um fator determinante importante para a transmissão peri-natal do HPV (Kaye *et al.*, 1994).

Pakarian *et al.* (1994) analisaram 32 crianças nascidas de 31 gestantes, das quais 16 apresentavam história prévia de NIC e/ou verrugas genitais. As amostras cervicais obtidas de gestantes com idade gestacional entre a 20^a e 38^a semana e amostras da boca e da região genital obtidas das crianças em 24 horas e em seis semanas após o nascimento, foram examinadas para o HPV 16, 18, 31 e 33. Vinte das 31 gestantes (65,0%) apresentaram resultado positivo para o DNA de HPV antes do parto. Doze das 32 crianças (38,0%) apresentaram resultado positivo para o DNA de HPV na avaliação de 24 horas e 8 (25,0%) na avaliação de seis semanas.

Este estudo demonstrou um risco de transmissão peri-natal do HPV-16 e 18 de 55,0%, com persistência da presença do vírus por um período de seis semanas. Contudo, não se sabe se a transmissão peri-natal destes tipos de HPV desempenharia um papel na

etiologia da displasia cervical e no desenvolvimento de doenças malignas em uma fase posterior da vida (Cason, 1996).

1.3 Epidemiologia das Infecções por HPV em Gestantes

Segundo alguns pesquisadores, com dados de estudos populacionais, há evidências de que a incidência da infecção genital pelo HPV, incluindo aquela por tipos de baixo potencial oncogênico, diminui com a idade a partir dos 25 anos (Ho *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1999). A idade, neste caso, representaria um fator importante na determinação da persistência da infecção pelo HPV e a detecção desta infecção em mulheres mais velhas, principalmente aquela por tipos virais de elevado potencial oncogênico, reflete a propensão deste grupo etário a uma infecção persistente (Ho *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 1999).

As taxas de infecção pelo HPV na gestação apresentado na literatura médica é inconsistente, variando de 5,0% a 50,0% (Kemp *et al.*, 1992; Tenti *et al.*, 1997). Esta diferença observada pode estar relacionada a diferentes fatores, que incluem desde a escolha do método utilizado para a detecção do vírus, diferenças nos fatores de risco da população analisada (tabagismo, promiscuidade, baixo nível sócio-econômico, associação a outras DSTs, antecedentes de displasia cervical ou de verrugas genitais) e diferenças metodológicas entre os estudos (grupos de comparação mal caracterizados, idade gestacional não específica para a coleta das amostras, idade materna não comparada) (Kemp *et al.*, 1992; Tenti *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm observado um declínio significativo da infecção por HPV na gestação à medida que a idade materna aumenta (de Roda Husman *et al.*, 1995; Fife *et al.*, 1996; Eppel *et al.*, 2000; Tenti *et al.*, 1997; Murta *et al.*, 2001). Estudos que analisaram o desfecho infecção por HPV com a variável idade estratificada observaram taxas de detecção do vírus variando de 19,0% a 40,0% no grupo de gestantes jovens (idade inferior a 25 anos) em oposição à taxa de 10,0% a 20,0% no grupo de gestantes com idade superior a 25 anos. Este mesmo padrão foi observado no grupo controle (pacientes não-grávidas) destes estudos (Hording *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 1990; de Roda Husman *et al.*, 1995; Eppel *et al.*, 2000).

Entre os obstetras, existe uma impressão geral de que há um aumento significativo da prevalência da infecção pelo HPV durante a gestação. Contudo, poucos estudos controlados suportam ou refutam este conceito.

A presença de diferentes fatores de risco independentes para a positividade do HPV (idade, frequência de contato sexual, número de parceiros, tabagismo, antecedente de outras doenças sexualmente transmissíveis, etc.) limita de maneira importante a comparação da prevalência desta infecção entre mulheres grávidas ou não. Os estudos epidemiológicos realizados até o momento, com o objetivo de avaliar o provável efeito da gestação na detecção da infecção pelo HPV, foram incapazes de mostrar alterações significativas em relação ao grupo controle de mulheres não-grávidas (Hording *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1991; de Roda Husman *et al.*, 1995; Chan-Claude *et al.*, 1996).

1.4. TRATAMENTO DE HPV

Para as lesões condilomatosas visíveis e subclínicas deve haver a remoção, que é feita atualmente com procedimentos citodestrutivos, como excisão cirúrgica com bisturi, LASER, ácido salicílico, eletrocirurgia, crioterapia, ácido bicloro e tricloroacético, cantaridina e ácido nítrico fumegante. Também são utilizados métodos antivirais e/ou imunomoduladores, como interferon- β e - γ , imiquimod, cidofovir, quimioterapia com bleomicina, 5-fluorouracil, podofilina, podofilotoxina (Fusté *et al.*, 2008; Huh & Roden, 2008). Para evitar a infecção por HPV, recomendam-se métodos contraceptivos de barreira, como preservativos masculinos e femininos, sendo importante manter abstinência sexual durante o tratamento (Jacyntho *et al.*, 1994).

1.4.1. Tratamento na Gestação

Algumas considerações especiais durante a gravidez devem ser analisadas, direcionando o tratamento conforme o período gestacional, a localização da infecção (genitália externa, vagina, colo uterino, uretra, região perianal), da sua apresentação clínica

(forma clínica ou sub-clínica) e da sua extensão e tem como objetivo principal a melhora dos sintomas (dor, irritação, sangramento, imagem corporal prejudicada, obstrução do canal de parto).

O tratamento da infecção durante a gestação não deve ser distinto daquele empregado para outras doenças virais, ou seja, o cuidado médico deve ser focado nas manifestações da infecção (Zoundi-Ouango *et al.*, 2006; Frega *et al.*, 2007).

Portanto, a partir do momento que a paciente encontra-se infectada, as opções de abordagem terapêutica restringem-se à identificação e o tratamento das verrugas genitais e das neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC II e III).

Com relação ao tratamento de verrugas genital durante a gestação, estas tendem a crescer rapidamente e se tornar friáveis. Isto é explicado pelo fato de que os níveis séricos dos hormônios esteróides estão elevados.

Lesões grandes ou extensas podem causar distócia de partes moles, obstruindo o canal de parto, laceração tecidual e/ou hemorragia profusa durante o parto vaginal, considerando ainda, o risco de transmissão neonatal do HPV, com o subsequente desenvolvimento da papilomatose laríngea em crianças nascidas de mães com antecedente ou presença de verrugas genitais na gestação (Silverberg *et al.*, 2003; Zoundi-Ouango *et al.*, 2006).

A infecção por HPV de alto risco, em especial os tipos HPV-16, 18, 31, podem progredir para lesões intraepiteliais cervicais graves, como a NIC II, NIC III e carcinoma invasor cervical. Porém, durante a gestação esta progressão apresenta uma menor probabilidade de ocorrer (Economos *et al.*, 1993; Siddiqui *et al.*, 2001; Paraskevaidis *et al.*, 2003).

Segundo Nguyen *et al.* (2000) e Douvier *et al.* (2003), os procedimentos excisionais, incluindo a eletro-cirurgia e a conização do colo uterino, realizados durante a gestação estão associados a complicações que incluem hemorragia significativa, abortamento, parto prematuro e infecção.

Segundo Ferenczy (2004), o terceiro trimestre da gestação deve ser considerado como o período ideal para o tratamento desta infecção devido ao menor risco de sua recorrência neste período.

1.5. DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR HPV

O HPV não pode ser cultivado em sistemas celulares e, por essa razão, o diagnóstico é usualmente obtido pela identificação de seus efeitos morfológicos sobre as células ou, pela detecção de seu DNA ou RNA. O exame clínico é o primeiro e mais importante passo para diagnosticar lesões associadas ao HPV. A citologia depende da esfoliação das células patológicas que representam a lesão subjacente sendo, portanto, útil na investigação da cérvix uterina e da vagina. O diagnóstico final é frequentemente obtido por uma biópsia que permite a identificação de lesões associadas ao HPV na maioria dos casos. Os métodos histológicos não permitem a identificação do tipo de HPV associado ao efeito citopático. Também não é possível identificar alterações mínimas associadas ao vírus ou infecção latente.

Os métodos para detectar a infecção por HPV podem ser classificados em *indiretos* (Colposcopia, Citologia e Histologia) e *diretos* (microscopia eletrônica, detecção do DNA por PCR, Hibridização e Sorologia) (Gross & Barrasco, 1999).

1.5.1. Métodos Indiretos

O primeiro passo para detectar lesões associadas ao HPV é o exame clínico. Esse exame é conveniente, porém é inespecífico (Murray *et al.*, 1999). A citologia (exame citopatológico ou Papanicolaou) apresenta limitações, pois depende da esfoliação das células patológicas, mas se mostra muito útil na investigação da cérvix uterina e da vagina (Gross & Barrasco, 1999). As células infectadas pelo HPV exibem alterações variadas, vistas em esfregaços e biópsias e, são denominadas de coilócitos (células com região perinuclear lípida e citoplasma denso). Além dessas alterações, as mudanças podem ser

observadas na forma e no tamanho celular e distribuição da cromatina nuclear (Murray *et al.*, 1999).

O diagnóstico final de HPV é freqüentemente obtido a partir de uma biópsia, que permite a identificação de lesões associadas ao vírus, incluindo neoplasias intra-epiteliais (NIC). As NIC são lesões associadas a viroses oncogênicas e apresentam risco para a progressão de câncer. A interpretação histológica, entretanto, não permite a tipagem do HPV nem a identificação de infecção latente, além de ser difícil quando as alterações vírus-associados são mínimas (Murray *et al.*, 1999).

O exame colpocitológico é um teste de *screening* utilizado primariamente na detecção de lesões epiteliais escamosas.

1.5.2. Métodos Diretos

A detecção de HPV por microscopia eletrônica identifica partículas virais em esfregaços ou amostras de tecidos. Este método, entretanto, é trabalhoso, de custo elevado e deve ser conduzido por técnicos especializados, não sendo assim apropriado para utilização em rotina. Além disso, o exame microscópico não permite tipificar o HPV (Gross & Barrasco, 1999).

Durante a última década, muitos métodos para detecção do DNA de HPV foram descritos cada um deles permite identificar um grande espectro de tipos de HPV. Entretanto, ainda nenhum deles preenche todos os requisitos necessários a um método de diagnóstico ideal (Coutlée *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1999; Poljak *et al.*, 1999).

A captura de híbridos de segunda geração (*Hybrid Capture* ou HC2) e uma variedade de protocolos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR ou *polymerase chain reaction*) utilizando iniciadores consenso e/ou degenerados são os métodos mais utilizados para a detecção de DNA de HPV em ensaios clínicos e estudos epidemiológicos (Peyton *et al.*, 1998).

1.5.2.1. Southern Blotting

Os métodos utilizados para a detecção do material genético de HPV são essencialmente de dois tipos: baseados em hibridização direta do DNA ou RNA viral presente nos espécimes, ou baseados na amplificação *in vitro* destes genomas, seguida de sua identificação tipo-específica, frequentemente por hibridização ou mapeamento por digestão do DNA viral por enzimas de restrição (Sambrook & Russel, 2003; Ifner & Villa, 2003).

A técnica de *Southern blot* consiste na transferência para um suporte sólido de DNA submetido à eletroforese em géis de agarose (membranas de nitrocelulose ou de náilon). O *Southern blot* pode ser um método mais sensível e específico na detecção do DNA de HPV (Gross & Barrasco, 1999).

A membrana contendo o DNA é submetida à hibridização com uma ou mais sondas de HPV tipo-específicas, geralmente sob condições controladas de estringência para que se possam detectar tantos tipos virais quantos forem possíveis (Murray *et al.*, 1999). As sondas marcadas radioativamente são mais sensíveis que as sondas marcadas enzimaticamente (sondas frias), podendo detectar de 0,1 a 0,01 cópias de HPV por célula (Murray *et al.*, 1999).

1.5.2.2. Dot blot

O *dot blot* é um método rápido e pouco dispendioso para analisar amostras de DNA ou RNA de HPV. É utilizado, principalmente, para rastreamento de grande número de amostras clínicas. Os ácidos nucleicos são colocados diretamente na membrana e, controles positivos e negativos também são aplicados na mesma membrana. A hibridização e lavagem são conduzidas da mesma maneira que no *Southern blot*. Uma vez que o DNA celular pode ser concentrado em uma pequena área de filtro, somente pequenas amostras de DNA são necessárias (0,1 a 1 ng) (Murray *et al.*, 1999).

1.5.2.3. Captura Híbrida (Digene)

Há alguns anos, tornou-se disponível uma metodologia que emprega a hibridização em solução, conhecida por captura de híbridos (Hybrid Capture, Digene Corporation). A sensibilidade analítica desta técnica é alta, sendo capaz de detectar 18 tipos diferentes de HPV presentes no espécime. Este ensaio está comercialmente disponível e vem sendo empregado em diversos estudos epidemiológicos (Lörincz *et al.*, 1996).

O sistema de Captura Híbrida, atualmente muito utilizado na detecção do HPV, é um ensaio de hibridização que utiliza anticorpos monoclonais na captura dos “híbridos” DNA:RNA-(HPV), detectando quantitativamente os vários tipos de HPV através de leitura por quimioluminescência.

Após a extração do DNA das amostras, são utilizadas sondas de RNA específicas para 18 dos 30 tipos de HPV que mais frequentemente acometem o trato genital, com formação de "híbridos" DNA:RNA. A captura dos híbridos é feita numa placa com micropoços revestidos por anticorpos anti-híbridos DNA:RNA. Adiciona-se um segundo anticorpo ligado a fosfatase alcalina (conjugado), que se liga ao híbrido e um substrato quimioluminescente, gerando luz, cuja intensidade é proporcional à quantidade de híbridos inicialmente formados. A luz emitida é medida como unidade de luz relativa (RLU) em um luminômetro e sua intensidade em relação ao valor do *cut off* denota a presença ou ausência da seqüência específica de DNA de HPV nos espécimes. Valores de leitura de RLU inferiores ao *cut off* podem também indicar que a quantidade de partículas de HPV está abaixo do limite de detecção do ensaios tipos detectados são divididos em 2 grupos: a) baixo risco e b) risco intermediário/alto.

1.5.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA de HPV pode ser amplificado seletivamente por PCR seguida da análise dos produtos por diferentes técnicas incluindo a eletroforese em gel, a hibridização tipo-específica, ou ainda pode ser acoplado ao seqüenciamento direto de DNA. A sensibilidade e a especificidade dos métodos baseados em PCR pode variar dependendo do conjunto de iniciadores utilizados, do tamanho do produto de PCR, das condições da reação, da

eficiência da polimerase de DNA empregada, e da habilidade para a detecção de vários tipos virais (Kleter *et al.*, 1998).

A PCR foi desenvolvida na metade dos anos 80 por Kary Müllis. É uma técnica que amplifica segmentos específicos de DNA dos agentes investigados, através da desnaturação por calor, pareamento com *primers* específicos e polimerização com enzimas termoestáveis (*Taq* DNA-polimerase) gerando-se milhões de fragmentos idênticos ao do DNA investigado, sendo justamente esta característica a que determina a grande sensibilidade do método. O diagnóstico é feito através da visualização e análise dos *amplicons* por exame sob luz ultravioleta. Posteriormente, pode ser realizada a tipagem por digestão com enzimas de restrição ou através de hibridização com sondas específicas para cada tipo de vírus. Obtendo-se assim, informação sobre os tipos de HPV presentes nas amostras (de Roda Husman *et al.*, 1995; Gravitt *et al.*, 2000).

Em teoria, uma reação de PCR pode produzir um milhão de cópias a partir de uma única molécula de DNA dupla fita após 30 ciclos de amplificação. Devido à sua versatilidade e altíssima sensibilidade, vários sistemas baseados em PCR encontram-se disponíveis.

Diferentes *primers* e procedimentos de PCR para a detecção de HPV têm sido descritos. Cada protocolo varia em sensibilidade e especificidade (Murray *et al.*, 1999). Os *primers* específicos também podem ser aplicados em sistemas de PCR *multiplex*, que possibilitam a amplificação de diferentes tipos de HPV em uma única reação, utilizando a mistura de um conjunto de *primers* (Xi *et al.*, 1997 Yoshinushi *et al.*, 1999).

A amplificação com *primers* consenso permite detectar um amplo espectro de genótipos de HPV, bem como identificar novos tipos virais (Gross & Barrasco, 1999). Diferentes conjuntos desses *primers* foram desenhados e construídos para este propósito. Os denominados de MY09/MY11, OBI/II, CPI/CPII e GP5+/6+ (Kleter *et al.*, 1998). Os *primers* MY09/MY11 e GP5+/6+ amplificam fragmentos de DNA correspondentes à seqüência da ORF de L1 do genoma do HPV, conservada entre os diferentes genótipos (de Roda Husman AM *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1999). Apesar de ser amplamente utilizados no diagnóstico de rotina de infecções por HPV, nenhum dos *primers* até agora desenhados, permite uma detecção adequada do espectro, ainda em expansão, de genótipos de HPV

anogenitais. Além disso, devido à limitada sensibilidade dos conjuntos de *primers consensus*, seu uso pode subestimar a real prevalência do HPV (Kleter *et al.*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

O vírus HPV é considerado um dos principais patógenos transmitidos sexualmente e a alta prevalência em pessoas assintomáticas não é somente um risco para o desenvolvimento de doenças associadas, mas também de favorecer a transmissão do agente infeccioso (Pinto *et al.*, 2005).

A transmissão sexual pelo HPV está bem estabelecida. No entanto, estudos epidemiológicos sugerem também, a possibilidade de transmissão não-sexual. Existem crescentes evidências de transmissão vertical, podendo a gravidez ser um fator de risco para essas infecções, uma vez que combina níveis hormonais elevados e imunossupressão (Bandyopadhyay & Chatterjee, 2006). Uma infecção assintomática por esses agentes em mulheres grávidas poderia trazer riscos adicionais tanto para a mãe como para a criança.

A gravidez apresenta peculiaridades que levam à determinação de conduta clínica ativa no pré-natal e durante o parto, portanto é de extrema importância evitar estas complicações materno-fetais inerentes à doença. A infecção por contágio no recém nascido é devido à passagem pelo canal de parto podendo desenvolver conjuntivite neonatal e mais tardiamente pneumonia.

A gestação é considerada um de muitos fatores de risco conhecidos que pode potencializar a patogenicidade e oncogênese, sugestionando uma possível influência hormonal na proliferação viral.

A utilização de métodos moleculares para detecção de DNA desses agentes tem contribuído muito para os estudos de prevalência, uma vez que aumentam a eficácia da detecção desses agentes na população. Entretanto, estudos epidemiológicos envolvendo gestantes ainda são escassos, apesar do importante benefício, tanto para a mãe quanto para a criança (Gencay *et al.*, 2001; Deng *et al.*; 2005).

O material biológico de escolha para detecção de HPV na população em geral tem sido o cérvico-vaginal. A utilização de amostras biológicas obtidas de forma mais simples e menos invasiva, que seria interessante, principalmente em casos de gestantes, permanece um desafio. Vários estudos têm demonstrado que a urina pode ser uma boa alternativa para detecção desses agentes tanto em homens quanto em mulheres. No entanto, a sensibilidade e especificidade de detecção são altamente influenciadas pelo método molecular empregado (Smits *et al.*, 2005; Prusty *et al.* 2005; Daponte *et al.*, 2006; Payan *et al.*, 2007; Jong *et al.*, 2008).

l Dessa forma, considerando o exposto acima, este trabalho tem como proposta verificar a presença de DNA de HPV em urina e lavado cérvico-vaginal de mulheres grávidas utilizando a PCR como método molecular, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura sobre o assunto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliação da urina de gestantes como material biológico para detecção de DNA de HPV para utilização em estudos de prevalência e diagnóstico quando comparado à detecção em secreção cérvico-vaginal.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência de HPV em gestantes considerando detecção de DNA em urina e em secreção cérvico-vaginal.

- Avaliar o desempenho do método para detecção de HPV na urina de gestantes quando em comparação com a detecção em secreção cérvico-vaginal.

- Correlacionar o desfecho (infecção por HPV) das gestantes com as variáveis preditoras do estudo (características sócio-comportamentais e demográficas da população).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. População e Local do Estudo

O estudo foi realizado com 139 gestantes que buscaram atendimento no Hospital Divina Providência, na cidade de Frederico Westphalen, pertencente à Região do Médio Alto Uruguai. As amostras foram colhidas consecutivamente, no período de outubro de 2006 a março de 2008.

4.2. Delineamento do Estudo

Estudo transversal, onde todas as gestantes atendidas foram convidadas a participar da pesquisa. Após terem aceitado participar do estudo, as mulheres assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e dados epidemiológicos foram coletados, através do preenchimento de um questionário.

4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão

Todas as gestantes internadas no hospital, e que aceitaram participar do estudo mediante consentimento informado. Foram excluídas do estudo todas as gestantes que estiveram em trabalho de parto durante o período do estudo.

4.4. Tamanho Amostral e Coleta de Amostras

O tamanho da amostra foi definido considerando o número de atendimento de cada sistema de saúde. Foram coletadas, para este estudo, 139 amostras de urina e 64 de secreções de gestantes, totalizando 203 amostras. Utilizou-se para a autocoleta um tubete com 1ml de solução conservadora e uma escova com haste longa (DIGENE). Para a realização a autocoleta as gestantes foram instruídas a:

- Introduzir a escova no canal vaginal e rodá-la 5 vezes no sentido horário, imediatamente após a coleta inserir a escova no tubete dentro da solução tampão e quebrar a

haste da escova. Fechar o tubete e agitar durante 30 segundos para homogeneizar a amostra (Cremonesi *et al.*, 2004).

4.5. Variáveis do Estudo

O desfecho foi a detecção de DNA de HPV por PCR na amostras de urina e de secreção cérvico-vaginal. Após terem sido arroladas, as participantes responderam a um questionário epidemiológico padronizado onde foram coletadas informações sobre características demográficas, morbidades pregressas, história de vida reprodutiva e de comportamento sexual (variáveis preditoras).

4.6. Processamento das amostras clínicas

A urina e a secreção cérvico-vaginal das gestantes foram coletadas, armazenadas em *freezer* -20°C e encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA.

Uma ficha técnica foi preenchida com dados referentes à amostra a ser analisada.

4.7. Análises Laboratoriais

4.7.1. Tratamento da amostra clínica

As amostras de urina e secreção cérvico-vaginal foram processadas e posteriormente, submetidas à PCR para detecção de DNA de HPV.

As amostras clínicas foram preparadas conforme protocolo descrito em Sperhacke *et al.* (2004). A purificação de DNA foi realizada utilizando uma resina de sílica após a liberação por fervura. O DNA uma vez purificado era adicionado à reação de PCR.

O DNA total extraído das amostras foi submetido a uma amplificação por PCR, utilizando-se *primers* complementares à região L1 do genoma viral do HPV (de Roda Husman *et al.*, 1995):

GP 5+ 5' ..TTTGTTACTGTGGTAGATTACTAC.. 3'

GP 6+ 5' ..GAATATGATTTACAGTTTATTTTTC..3'

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase, *primers* na concentração de 50 ng/µL cada; 5 µL de tampão de reação 10X contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,3, 500 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 4 µL de dNTPs com 0,2 mM de cada nucleotídeo, DNA e H₂O q.s.p.

As reações foram submetidas às seguintes condições para amplificação em aparelho termociclador; 95°C por 5 min, para desnaturação; 40 ciclos subseqüentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação; 72°C por 10 min para extensão final.

Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, sob luz ultravioleta e comparados a um controle positivo de reação da PCR.

4.8. Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) em 10 de agosto de 2007, sob o número de protocolo 287H.

4.9. Análise dos Dados

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS (versão 16.0). Foi descrita a frequência de DNA de HPV em toda a amostra estudada e por faixa etária, bem como as características sócio-comportamentais da população em estudo.

O Teste do Qui-Quadrado (χ^2) e/ou Exato de Fisher foram utilizados para comparar as variáveis categóricas com a presença ou ausência do desfecho e o teste *t de student* (ou não paramétrico correspondente) para comparar as variáveis contínuas com a presença ou não do desfecho. Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Razão de Chances (RC) foi calculada para as análises uni/bivariadas e multivariadas, através do método de Regressão Logística, com seu correspondente Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

O Teste *Kappa* (*k value*) foi utilizado para comparar a detecção do vírus HPV na urina e no lavado cérvico-vaginal. Os testes de especificidade, sensibilidade e valores preditivos positivo (vpp) e negativos (vpn) também foram calculados.

5. Resultados e Discussão

As 203 amostras foram analisadas pelo teste de PCR para a detecção de DNA de HPV. Foram consideradas positivas para a PCR as amostras, que após amplificação, foi possível visualizar um fragmento de 150 pb. A prevalência de HPV nas gestantes considerando a urina como material biológico foi de 25,2% (35/139) e na secreção cérvico-vaginal, foi de 39,0% (25/64).

Nossos resultados são corroborados por outros estudos na literatura científica. As prevalências observadas neste estudo estão dentro do amplo intervalo relatado na literatura, onde a prevalência e a incidência da infecção cervical pelo HPV mostram grande variação, de acordo com o método diagnóstico utilizado, mas também por refletir as variações quanto ao comportamento sexual entre as populações (Dillner *et al.*, 2000; Muñoz, 2000).

Vários estudos realizados no Brasil têm mostrado diferentes índices de prevalência de infecção por HPV. Em uma cidade do interior do Rio Grande do Sul, considerada de baixo risco, foi encontrada uma frequência de DNA de HPV de 13,0% (Nonnenmacher *et al.*, 2003). Outro estudo realizado em São Paulo, entre mulheres de baixa renda, também referiu uma frequência de mulheres HPV positivas de 26,2% (Villa *et al.*, 2000).

Um estudo transversal, caracterizado por ser uma pesquisa multicêntrica de rastreamento e triagem “*Latin America Screening Study*” (LAMS), englobando países participantes como Brasil (São Paulo, Campinas e Porto Alegre) e Argentina (Buenos Aires) foi realizado. Neste trabalho, foram arroladas 2300 mulheres de diferentes faixas etárias. A prevalência de infecção por HPV foi de 17,8%; nos grupos etários, a prevalência encontrada foi de 27,1% (<25 anos); 21,3% (25–34 anos); 12,1% (35–44 anos); 12,0% (45–54 anos) e 13,9% (55–65 anos). Em mulheres com citologia normal, a prevalência foi de 14,3% (Rama *et al*, 2008).

Jong *et al.* (2008), em mulheres HIV positivas, estudando a prevalência de HPV em urina e lavado cérvico-vaginal, encontrou uma prevalência de 81,5% (22/27) para urina e de 51,9% (14/27), para lavado cérvico-vaginal, respectivamente ($p=0,01$). A concordância para HPV positividade e negatividade entre urina e amostras de esfregaços cervicais foi de 71,0%. Sete mulheres (25,9%) tiveram um esfregaço cervical anormal de NIC II ou superior. Em todos estes casos, nas amostras de urina o DNA de HPV foi detectado.

Em Daponte *et al.* (2006), a prevalência de DNA de HPV encontrada foi de 48,1% para lavado cérvico-vaginal e de 33,8%, para urina.

Já Eppel *et al.* (2000) encontrou uma prevalência de 24,6% (55/226) de infecção por HPV em urinas de 226 mulheres, em um estudo de coorte.

Segundo Ambruster-Moraes *et al.* (1994), a detecção do HPV no líquido amniótico é, sem dúvida, a maior fonte de discussão. A transmissão vertical do HPV é fortemente sugerida considerando a ocorrência de papiloma juvenil de laringe em crianças com menos de 2 anos e a partir de alguns casos relatados de nascimentos em que o recém-nato apresentava condiloma genital já ao nascer (Chan-Claude *et al.*, 1996). Todavia, a prevalência do papiloma de laringe é até 1.000 vezes menor do que a infecção genital materna à época do parto, o que questiona a real contribuição da transmissão vertical.

Ambruster-Moraes *et al.* (1994) detectaram a presença de DNA do HPV-16 ou 18 no líquido amniótico de 24 de 37 gestantes portadoras de doença cervical relacionada ao HPV, resultando numa prevalência de 64,9% (IC95%: 49,5 - 80,3).

Existem evidências da presença de HPV no líquido amniótico e em células mononucleares no sangue periférico ou cordão umbilical. Todavia, na urina, não encontramos estas evidências. Neste líquido, a presença do HPV pode estar relacionada apenas com a contaminação do epitélio do trato urinário baixo e não propriamente por filtração renal de partículas virais.

Tabela 1. Comparação da Detecção de DNA de HPV em amostras de urina e secreção cérvico-vaginal

Variáveis	PCR Secreção Vaginal		Total	P*
	HPV (+)	HPV (-)		
PCR Urina				
HPV (+)	18	7	25	<0,001
HPV (-)	7	32	39	
Total	25	39	64	

Teste Kappa (*k-value*) = 0,541; Fisher's Exact Test *p-value* = <0,001. Através do Teste Kappa, é possível mensurar a concordância entre dois testes; neste caso, o nível de concordância foi considerado moderado.

Em nosso estudo, das 64 pacientes que tiveram amostra coletada para urina e secreção cérvico-vaginal, 39,0% (25/64) apresentaram positividade de DNA de HPV em ambos os materiais biológicos (urina e lavado cérvico-vaginal) (Tabela 1). O Teste Kappa (*k value*) foi utilizado para mensurar a concordância entre a detecção por urina e lavado cérvico-vaginal, e apresentou entre esta relação uma forte concordância (*k* =54,1%; IC95%: 29,6%-78,6%; *p*<0,001).

Houve diferença significativa entre os dois métodos diagnósticos (urina versus secreção cérvico-vaginal) (*p*<0,001), com uma sensibilidade de 72,0% (IC95%: 50,5%-87,9%) e especificidade de 82,1% (IC95%: 66,4%-92,5%) para a urina. Os valores preditivos positivo e negativo foram 72,0% (IC95%: 50,6%-87,9%) e 82,0% (IC95%: 66,4%-92,5%), respectivamente. A concordância encontrada entre os dois métodos foi de 82,0%, neste estudo. Estes resultados são explicados pela concordância entre os dois métodos e pelos resultados discrepantes (n=7), ou seja, pela não-concordância entre os achados de urina e secreção cérvico-vaginal.

Payan *et al.* (2007) realizou um estudo com PCR em tempo real (Mx4000/Stratagene; LightCycler/Roche Diagnostics) com 333 mulheres encaminhadas para exame ginecológico. Foram coletadas amostras de lavado cérvico-vaginal e urina. Payan e colaboradores encontraram uma sensibilidade de 91,2% na urina e especificidade de 96,3% nas amostras de lavado cervical. Entre os dois métodos, a concordância foi de 94,4%. A prevalência de DNA de HPV nas amostras de urina foi de 37,3% (66/177); nas amostras cérvico-vaginais, a prevalência foi de 45,0% (150/333).

A presença do HPV nos fluidos corporais tem sido motivo de muito interesse do ponto-de-vista clínico e de pesquisa. A presença do HPV no líquido amniótico, antes do parto, aborda uma grande discussão em torno da contaminação do feto antes de seu nascimento (Tseng *et al.*, 1998).

Outra implicação importante é a comprovação da não exclusividade da transmissão sexual.

Já em relação a outros fluidos, como no sangue e urina, a presença do HPV não traz uma implicação clínica direta. Na urina esta presença pode estar associada à existência de lesões intra-uretrais. No sangue sua presença apoiaria as hipóteses de que as infecções por HPV podem ser sistêmicas. Também poderia ser a base para o desenvolvimento de testes sangüíneos de rastreio de sua presença (Pao *et al.*, 1991; Geddy *et al.*, 1993). Entretanto, ainda existem na literatura poucos trabalhos a respeito do diagnóstico de HPV em amostras como a urina e sangue.

Muitos estudos têm avaliado a relação entre a idade gestacional da mulher com a infecção por HPV.

Murta *et al.* (2001) em seu estudo sobre a influência da idade materna do período gestacional na infecção pelo papilomavírus humano sugestionam que a maior incidência de alterações citológicas causadas pelo vírus ocorre nas pacientes grávidas mais jovens. A idade, segundo o autor, é um fator importante no desenvolvimento da infecção, também, em mulheres jovens não grávidas.

Ainda ressalta o pesquisador que na gravidez há um aumento da infecção por HPV, principalmente na segunda metade do período gestacional.

Um estudo realizado por Meisels (1992) encontrou um aumento da prevalência de HPV na segunda metade da gestação em relação à primeira metade ($p < 0,001$). Outro pesquisador também encontrou resultados semelhantes ($p = 0,02$), corroborando com os dados demais encontrados na literatura (Gopalkrishna *et al.*, 1995).

Murta *et al.* (2001) analisando dados citológicos com a infecção por HPV, não encontrou associação significativa com as alterações citológicas e a idade gestacional.

Ambruster-Moraes *et al.* (2000) encontraram uma positividade de 48,0% de DNA de HPV em pacientes gestantes. Destas, 75,0% estavam na 25^o semana de gestação.

Nowak *et al.* (2007), entre 2005 e 2006, em uma clínica de gravidez de alto risco, desenvolveu um estudo com 400 gestantes, sendo 180 no segundo trimestre de gestação e 220 no terceiro trimestre. Foi encontrada uma prevalência por HPV de 4,5%, 2,5% de HPV-16 e 1,7% de HPV-18 respectivamente. A co-infecção por HPV-16 e HPV-18 foi de 0,2%. Nas 180 gestantes do segundo trimestre de gestação, a prevalência foi de 4,4%, sendo de 2,8% para HPV-16 e 1,7% para HPV-18. No terceiro trimestre, 2,3% foi de HPV-16, 1,8% de HPV-18 e co-infecção de 0,4%. Infecção por HPV de baixo risco (HPV-6) foi de 1,0%, sendo 1,1% no segundo trimestre e 0,9% no terceiro trimestre.

Em nosso estudo, a prevalência de HPV no período gestacional mostrou-se equivalente. Tanto para a secreção cérvico-vaginal e a urina, a maior prevalência de HPV foi encontrada no terceiro trimestre de gestação, com 40,0% (10/25) e 60,0% (21/35), respectivamente (Figura 5). Não foi encontrada associação do período gestacional (do primeiro trimestre ao terceiro trimestre) com a infecção por HPV, tanto na urina ($p = 0,30$) quanto no lavado cérvico-vaginal ($p = 0,94$).

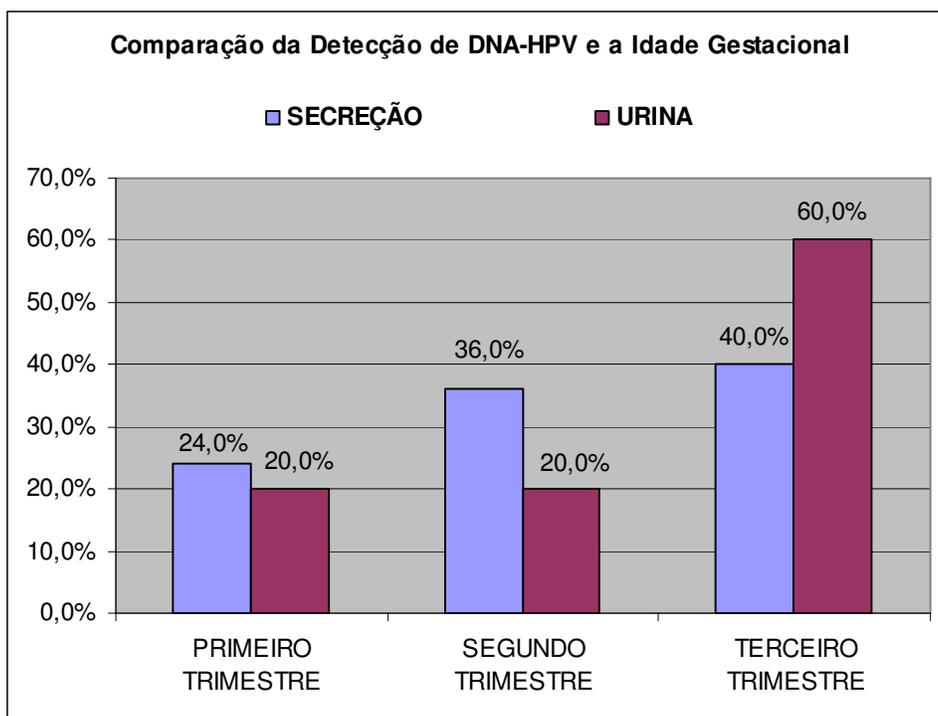


Figura 5. Comparação da prevalência de DNA de HPV e a idade gestacional na urina e secreção cérvico-vaginal.

Segundo Sethi *et al.* (1998), a resposta imunológica contra o HPV-16 é maior em mulheres não gestantes do que nas gestantes sugerindo que o período gestacional possa reduzir a resposta imune contra o vírus.

Mesmo diante destes estudos, ainda é inconsistente os dados de prevalência de infecção por HPV em gestantes. Alguns estudos observaram taxas que variam de 5,0% a 50,0% (Kemp *et al.*, 1992; Tenti *et al.*, 1997). Esta vasta variação pode ser explicada por existirem outros cofatores envolvidos na manifestação viral, como o fumo, o número de parceiros sexuais ao longo da vida, nível sócio-econômico desfavorecido, infecção com outras DSTs e história de condilomas, bem como a idade materna.

Eppel *et al.* (2000) afirmam que ainda não há estudos conclusivos sobre a influência da idade gestacional e a infecção por HPV. Alguns estudos encontraram elevada prevalência da infecção com o avanço da idade materna, porém outros estudos reportaram não haver associação entre a idade gestacional e as taxas de infecção por HPV.

Neste estudo também se avaliou as características sócio-demográficas e comportamentais das pacientes (Tabela 2), bem como a distribuição das variáveis de acordo com a presença de HPV nas amostras de urina e lavado cérvico-vaginal (Tabela 3).

A idade média das mulheres foi de 25,5 anos (14-43), com sexarca de 16,2 anos (12-40) e idade gestacional de 19 anos (12-43).

Tabela 2. Distribuição das Características Sócio-Demográficas da População em Estudo

Variáveis	n (%)
Idade (anos) (n=133)	
≤ 34	116 (87,4%)
≥ 35	17 (12,6%)
Nível de Escolaridade (n=133)	
Até Primeiro Grau Completo	98 (74,0%)
Segundo Grau Incompleto a 2º Grau Completo	31 (23,6%)
Terceiro Grau Completo a Superior	03 (2,4%)
Estado Marital (n=133)	
Com companheiro fixo	99 (74,8%)
Sem companheiro fixo	34 (25,2%)
Fumo (n=133)	
Sim	29 (22,0%)
Não	104 (78,0%)
Tempo de Fumo (em anos) (n=28)	
< 10	16 (57,1%)
≥ 10	12 (42,9%)
Menarca (em anos) (n=133)	
≤12	60 (45,7%)
≥13	73 (54,3%)
Idade na Primeira Relação Sexual (Sexarca) (n=133)	
< 20	122 (92,1%)
≥ 20	11 (7,9%)
Parceiros Sexuais na Vida (parceiros) (n=133)	
< 2	72 (54,3%)
≥ 2	61 (45,7%)
Uso de Anticonceptivo Oral (n=132)	
Sim	117 (88,1%)
Não	16 (11,9%)
Idade Gestacional (n=133)	
1-20 semanas	54 (40,9%)
21-40 semanas	79 (59,1%)
História de Condiloma Genital (n=98)	
Sim	06 (6,1%)
Não	92 (93,9%)
História de Infecção por Sífilis (n=99)	
Sim	05 (5,1%)
Não	94 (94,9%)
História de HIV (n=110)	
Sim	01 (0,9%)
Não	109 (99,1%)
História de Infecção por Gonorréia (n=96)	
Sim	04 (4,2%)
Não	92 (95,8%)
História de Infecção por Clamídia (n=69)	
Sim	05 (7,2%)
Não	64 (92,8%)
História de Infecção por Herpes (n=88)	
Sim	04 (4,5%)
Não	84 (95,5%)
História de Infecção por Cândida (n=102)	
Sim	44 (43,1%)
Não	58 (56,9%)

Tabela 3. Distribuição das Variáveis estudadas de acordo com a presença de HPV nas amostras de urina e lavado cérvico-vaginal

Variáveis	HPV (+) Secreção (n=25)	<i>p</i> *	HPV (+) Urina (n=35)	<i>p</i> *
Idade				
≤34	75,0%	0,38	78,9%	0,06
>35	25,0%		21,1%	
Escolaridade				
Até 1º Grau Completo	66,7%	0,21	71,1%	0,37
Segundo Grau Incompleto a 2º Grau Completo	33,3%		28,9%	
Terceiro Grau Completo a Superior	0,0%		0,0%	
Estado Marital				
Com companheiro fixo	62,5%	1,00	76,3%	0,80
Sem companheiro fixo	37,5%		23,7%	
Fumo				
Sim	20,8%	0,61	23,7%	0,77
Não	79,2%		76,3%	
Uso de Anticoncepcivo Oral				
Sim	79,2%	0,61	84,2%	0,37
Não	20,8%		15,8%	
Idade Gestacional				
1-20 semanas	62,5%	0,81	44,7%	0,57
21-40 semanas	37,5%		55,3%	
Sexarca				
< 20	98,5%	0,17	89,5%	0,008
≥ 20	4,2%		10,5%	
Menarca				
≤12	37,5%	0,81	36,8%	0,2
≥13	62,5%		63,2%	

* Valores de *p* para o Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fischer (valores significativos para um $p < 0,05$).

** Valores de significância limítrofe de *p* para o Teste de Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Vários cofatores presentes na gestação podem estar atuando juntos, aumentando a proliferação viral e conseqüentemente contribuindo para a oncogenicidade. Já está bem estabelecido que a infecção por HPV de alto risco é mais freqüente na gestação do que em mulheres não gestantes.

Em nosso estudo, encontramos associação de história de infecção por herpes genital com a idade materna ≤ 34 anos ($p=0,03$); história de cândida com história de infecção por clamídia ($p=0,005$; OR=3,6; IC95%:1,9-6,8); idade materna ≥ 35 anos com positividade para HPV no lavado cérvico-vaginal ($p=0,04$; OR=2,9; IC95%:1,04-8,2).

Mulheres que tiveram a primeira relação sexual com idade ≤ 20 anos apresentaram associação positiva com a infecção por HPV, detectado através do teste de PCR na urina ($p=0,008$).

Além da idade gestacional que pode influenciar o desenvolvimento do câncer cervical, existem outros co-fatores que têm sido associados à carcinogênese, tais como: o uso de anticoncepcionais orais, paridade, tabagismo, imunossupressão, particularmente relatado em paciente com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecções com outras doenças sexualmente transmissíveis e a deficiência nutricional. Porém, seus verdadeiros papéis no desenvolvimento do câncer ainda permanecem obscuros (Hildesheim *et al.*, 2002).

A idade da sexarca, o número de parceiros sexuais, história de DSTs e outras características de atividade sexual estão ligadas ao processo de adquirir o vírus do HPV e não são considerados co-fatores para a progressão da infecção pelo vírus (Rousseau *et al.*, 2003).

A influência do comportamento sexual tem sido muito estudada como fator de risco para o câncer cervical em diversos estudos epidemiológicos. Alguns estudos encontraram associação do uso de ACO (anticoncepcional) e câncer de colo uterino, porém existem controvérsias (Lacey *et al.*, 1999; Hildesheim *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2002).

Conforme relatos da literatura, o uso de ACO tem sido associado como co-fator de risco para o câncer cervical. Nos Estados Unidos, um estudo apresentou um OR=17,1 (IC95%=1,5-188,2) para os casos de adenocarcinomas *in situ*; entretanto, o risco é maior conforme o aumento do período de uso de ACO (Lacey *et al.*, 1999). Já na Costa Rica o uso de ACO por cinco anos

ou mais quando comparado às mulheres que nunca utilizaram ACO foi identificado um OR=3,1 (IC95%=1,1-9,1), e esta associação foi observada entre mulheres que tiveram poucas gestações e no grupo de casos de HSIL e câncer incluindo apenas trinta casos (Hildesheim *et al.*, 2001).

Em recente metanálise, concluiu-se que o uso por longa duração aumenta o risco de câncer cervical (Smith *et al.*, 2003).

Em outro estudo prospectivo com 1675 mulheres, não foi encontrada associação entre câncer cervical e NIC III com o uso corrente de ACO comparado com mulheres que nunca o utilizaram (Castle *et al.*, 2002).

Em nosso estudo não foi observado associação positiva do uso de ACO com a infecção por HPV. Um outro co-fator de característica sócio-comportamental de extrema importância na carcinogênese cervical e que tem sido muito relatado em diversos estudos é o fumo. O tabaco aumenta o risco de HSIL e câncer cervical, e em alguns casos específicos de câncer, foi encontrada quantidade significativa de nicotina na secreção cervical das pacientes (Prokopczyk *et al.*, 1997; Poppe *et al.*, 1995; Castle *et al.*, 2002; Giulian *et al.*, 2002).

A nicotina exerce efeito carcinogênico, agindo diretamente sobre o mecanismo de mitose celular, causando danos genômicos e diminuindo a resposta imune local contra infecções virais (Prokopczyk *et al.*, 1997; Poppe *et al.*, 1995). As células de Langerhans são componentes importantes na vigilância imunológica celular, pois são apresentadoras de antígeno e ativam especificamente os linfócitos T-CD4. A elevada concentração dos derivados do tabaco tem sido associada à depressão das células de Langerhans. Alguns estudos observaram associação entre o fumo e a redução da densidade dessas células (Poppe *et al.*, 1995; Prokopczyk *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, não foi encontrada associação significativa entre o fumo e a infecção por HPV.

No Estado do Rio Grande do Sul tem sido observado um aumento da mortalidade por câncer de colo uterino ao longo dos últimos 20 anos, em relação a outros estados da Região Sul do Brasil, em todas as faixas etárias, sendo maior o incremento anual na faixa de 50 a 64 anos. (Castellsagué *et al.*, 2002, Kalakun & Bozzetti, 2005). Sendo o Rio Grande do Sul, o

estado brasileiro onde é observada a prevalência de fumo mais elevada, seria possível especular que o fumo possa estar atuando como co-fator junto ao HPV e contribuindo assim para o aumento da morbidade e mortalidade por esta neoplasia em nosso meio. Se esta especulação estiver correta, é essencial que se combine junto às medidas de prevenção para a infecção genital pelo HPV, medidas para redução da exposição das mulheres ao fumo.

6. Conclusão

E analisando todos os resultados encontrados, podemos observar que a prevalência HPV na urina secreção cérvico-vaginal de mulheres gestantes é alta e os resultados mostraram-se altamente concordantes. Por isso, amostras de urina podem ser utilizadas como meio de testes para a identificação do vírus HPV. Para gestantes, o diagnóstico de DNA de HPV em amostras de urina é um meio simples, confiável e não-invasivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL MNC, MARTINS CAS, ZONTA MA. Correlação entre colpocitologia inflamatória e detecção do papilomavírus humano por reação em cadeia de polimerase (PCR). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Vol. 37(2): 103-105, 2005.

AF GEIJERSSTAM V, WANG Z, LEWENSOHN-FUCHS I, EKLUND C, SCHILLER JT, FORSGREN M *et al.* Trends in seroprevalence of human papillomavirus type 16 among pregnant women in Stockholm, Sweden, during 1969-1989. *Int J Cancer*. 1998 May 4;76(3):341-4.

ALTIOK S. Molecular markers in cervical cytology. *Clin Lab Med* 23:709-28; 2003.

ARMBRUSTER-MORAES E, IOSHIMOTO LM, LEAO E, ZUGAIB M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol* 54:152-8; 1994.

ARMBRUSTER-MORAES E, IOSHIMOTO LM, LEAO E, ZUGAIB M. Prevalence of "high risk" human papillomavirus in the lower genital tract of Brazilian gravidas. *Int J Gynaecol Obstet* 69:223-7; 2000.

BALAZIC J, MASERA A, POLJAK M. Sudden death caused by laryngeal papillomatosis. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:111-3; 1997.

BANDYOPADHYAY S & CHATTERJEE R. HPV Viral load determination during pregnancy as a possible cervical cancer risk. *J Exp Clin Câncer Res* Vol. 25(1): 29-28, 2006.

BOSCH FX, DE SANJOSÉ S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*. 2007;23(4):213-27.

BOSCH FX, CASTELLSAGUÉ X, DE SANJOSÉ S. HPV and cervical cancer: screening or vaccination? *Br J Cancer*. 2008 Jan 15;98(1):15-21. Epub 2008 Jan 8.

CAMPION MJ, SEDLACEK TV. Colposcopy in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 20:153-63; 1996.

CAMPOS, S.F; HAAS, P; SMANIOTO, R; SILVA, E.D.C. Papiloma Vírus Humano, Revista Brasileira de Análises Clínicas BAC, vol. 36(3): 137-142, 2004.

CARVALHO JJM, OYAKAWA N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural 2000; P. 143.

CASON J, KAYE JN, JEWERS RJ, KAMBO PK, BIBLE JM, KELL B *et al.* Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol* 47:209-18; 1995.

CASON J. Perinatal acquisition of cervical cancer-associated papillomaviruses. *Br J Obstet Gynaecol* 103:853-8; 1996.

CASTELLSAGUÉ X, BOSCH FX, MUÑOZ N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89(2):191-192, 2002.

CASTLE PE, WACHOLDER S, LORINCZ AT, SCOTT DR, SHERMAN ME, GLASS AG *et al.* Perspective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* Volume 94:1406–1414, 2002.

CHANG-CLAUDE J, SCHNEIDER A, SMITH EM, BLETTNER M, WAHRENDORF J, TUREK LP. Longitudinal study of the effects of pregnancy and other factors on detection of HPV. *Gynecol Oncol* 60:255-62; 1996.

CHAN PJ, SERAJ IM, KALUGDAN TH, KING A. Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet* 13:516-9; 1996.

CHAN PK, CHANG AR, TAM WH, CHEUNG JL, CHENG AF. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus infection: comparison between pregnant and non-pregnant controls. *J Med Virol* 67:583-8; 2002.

COUTLEE F, MAURAND MH, PROVENCHIER D, FRANCO F *et al.* The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* Aug; 8(2):123-141, 1997.

CREMONESI A, TAROMARU E, DÔRES G, CASTELO A, FILHO A, VERAS T, JÚNIOR H. Reprodutibilidade do Teste de Captura Híbrida de Segunda Geração na Detecção de HPV de Alto Risco em Material Cervicovaginal de autocoleta. *DST-J bras Doenças Sex Transm* 16(4): 5-10, 2004.

DAPONTE A, POURNARAS S, MADEMTZIS I, HADJICHRISTODOULOU C, KOSTOPOULOU E, MANIATIS AN *et al.* Evaluation of high-risk human papillomavirus types PCR detection in paired urine and cervical samples of women with abnormal cytology. *J Clin Virol*. Jul; 36 (3):189-93, 2006.

DA SILVA CS; ADAD SJ; HAZARABEDIAN DE SOUZA MA *et al.* Increased Frequency of Bacterial Vaginosis and *Chlamydia trachomatis* in Pregnant Women with Human Papillomavirus Infection. *Gynecol Obstet Invest* 58:189-193, 2004.

DE RODA HUSMAN AM, WALBOOMERS JM, HOPMAN E, BLEKER OP, HELMERHORST TM, ROZENDAAL L *et al.* HPV prevalence in cytomorphologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern. *J Med Virol* 46:97-102; 1995.

DENG D, WEN L, CHEN W, LING X. Asymptomatic genital infection of human papillomavirus in pregnant women and the vertical transmission route. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* Vol. 25 (3): 343-5, 2005.

DERKAY CS. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:1386-91; 1995.

DILLNER J, MEIJER CJ, VON KROGH G. Epidemiology of human papillomavirus infection. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 205:194-200, 2000.

DOUVIER S, FILIPUZZI L, SAGOT P. Prise en charge d'une neoplasie intra-epitheliale du col de l'uterus en cours de grossesse. *Gynecol Obstet Fertil* 31:851-5; 2003.

DUNNE EF, MARKOWITZ LE. Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis.* 2006 Sep 1;43(5):624-9. *Epub* 2006 Jul 26.

ECONOMOS K, VERIDIANO VP, DELKE I, COLLADO ML, TANCER ML. Abnormal cervical cytology in pregnancy: a 17-year experience. *Obstet Gynecol* 81:915-8; 1993.

EPPEL W, WORDA C, FRIGO P, ULM M, KUCERA E, CZERWENKA K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol* 96:337-41; 2000.

FERENCZY A. Managing pregnant patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Contemp Ob Gyn* 49:76-89; 2004.

FIFE KH, KATZ BP, ROUSH J, HANDY VD, BROWN DR, HANSELL R. Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 174:1487-93; 1996.

FONSECA ASK, LUNGE VR and IKUTA N. Detecção e tipagem molecular de papilomavirus humano (HPV) em amostras de cérvix uterino. *Laes & Haes*, 114: 148-154, 1998.

FRANCO EL, ROHAN TE, VILLA LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:506-11; 1999.

FREGA A, SCIRPA P, COROSU R, VERRICO M, SCARCIGLIA ML, PRIMIERI MR *et al.* Clinical management and follow-up of squamous intraepithelial cervical lesions during pregnancy and postpartum. *Anticancer Res* 2007 Jul-Aug;27(4C):2743-6.

FUSTÉ P, SANTAMARÍA X, CARRERAS R. New therapeutic strategies for human papillomavirus related anogenital lesions in HIV patients: highly active antiretroviral therapy and HPV vaccines. *Med Clin (Barc)* Jun 7;131(1):30-4, 2008.

GEDDY PM, WELLS M, LACEY CJ. Lack of detection of human papillomavirus DNA in male urine samples. *Genitourin Med* Aug;69(4):276-9, 1993.

GENCAY M, KOSKINIEMI M, FELLMAN V, AMMALA P, VAHERI A, PUOLAKKAINEN M. Chlamydia trachomatis infection in mothers with preterm delivery and

in their newborn infants. *Acta pathologica microbiologica et Immunologica Scandinavica* 109 (9): 636-40, 2001.

GENEST DR, STEIN L, CIBAS E, SHEETS E, ZITZ JC, CRUM CP. A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursors: criteria, reproducibility, and viral correlates. *Hum Pathol.* 1993 Jul;24(7):730-6.

GILLISON ML, KOCH WM, CAPONE RB, SPAFFORD M, WESTRA WH, WU L *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):709-20.

GIULIAN AR, SEDJO RL, ROE DJ, HARRI R, BALDWI S, PAPPENFUSS MR *et al.* Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control* Volume 13: 839–846, 2002.

GOPALKRISHNA V, MURTHY NS, SHARMA JK, ROY M, DAS DK, LUTHRA UK *et al.* Increased human papillomavirus infection with the increasing number of pregnancies in Indian women. *J Infect Dis.* 1995 Jan;171(1):254-5.

GRAVITT PE, PEYTON CL, ALESSI TQ, WHEELER CM, COUTLEE F, HILDESHEIM A *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38(1): 357-61 2000.

GROSS G. E. & BARRASCO R. Infecção por papilomavírus. in: Atlas clínico de HPV. Ed. Artes Médicas Sul. 1-432, 1999.

HAGENSEE ME, SLAVINSKY J, GAFFGA CM, SUROS J, KISSINGER P, MARTIN DH. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Obstet Gynecol* 94:653-8; 1999.

HERNÁNDEZ-GIRÓN C, SMITH JS, LORINCZ A, LAZCANO E, HERNÁNDEZ-AVILA M, SALMERÓN J. High-risk human papillomavirus detection and related risk factors among pregnant and nonpregnant women in Mexico. *Sex Transm Dis* Oct; 32(10):613-8, 2005.

HILDESHEIM A, HERRERO R, CASTLE PE, WACHOLDER S, BRATTI MC, SHERMAN ME *et al.* HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br. J Cancer* Volume 84:1219–1226, 2001.

<http://hpvinfo.com.br/index.html>

HO GYF, BIERMAN R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338:423-8; 1998.

HOORY T, MONIE A, GRAVITT P, WU TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc.* 2008 Mar;107(3):198-217.

HORDING U, IVERSEN AK, SEBBELOV A, BOCK JE, NORRILD B. Prevalence of human papillomavirus types 11, 16 and 18 in cervical swabs. A study of 1362 pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 35:191-8; 1990.

HOWLEY PM. *Papillomavirinae: the viruses and their replication.* In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM editores. *Virology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, P. 2045-2076, 1996.

HUH WK, RODEN RB. The future of vaccines for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 109(2 Suppl):S48-56, 2008

IFTNER T, VILLA LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* (31):80-8, 2003.

JACYNTHO C; ALMEIDA FILHO G & MALDONADO P. HPV. Infecção Genital Feminina e Masculina, Ed. Revinter, 1994.

JALIL EM. Prevalência da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em gestantes infectadas ou não pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1 em Ribeirão Preto, SP. Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo; 2008.

JANICEK MF, AVERETTE HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin.* 2001 Mar-Apr;51(2):92-114; quiz 115-8.

JONG E, MULDER JW, VAN GORP EC, WAGENAAR JK, DERKSEN J, WESTERGA J *et al.* The prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in paired urine and cervical smear samples of HIV-infected women. *J Clin Virol* Feb;41(2):111-5, 2008.

KALAKUN L, BOZZETTI MC. Evolution of uterine cervical cancer mortality from 1979 to 1998 in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Rio de Janeiro: *Cad Saúde Pública Jan-Fev* 21(1):299-309, 2005.

KAYE JN, CASON J, PAKARIAN FB, JEWERS RJ, KELL B, BIBLE J. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* 44:415-21; 1994.

KEMP EA, HAKENEWERTH AM, LAURENT SL, GRAVITT PE, STOERKER J. Human papillomavirus prevalence in pregnancy. *Obstet Gynecol* 79:649-56; 1992.

KLETER B, VAN DOORN L J, TER SCHEGGET J, SCHRAUWEN L *et al.* Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.*153:1731-1739, 1998.

KOUTSKY, L, KIVIAT, N. Genital Human Papillomavirus.” In: King Holmes *et al.*, eds. Sexually Transmitted Diseases, 3^o ed. New York: Mc Graw Hill, 1997.

KULASINGAM SL, HUGHES JP, KIVIAT NB, MAO C, WEISS NS, KUYPERS JM *et al.* Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA.* 2002 Oct 9;288(14):1749-57.

LACEY JV JR, BRINTON LA, ABBAS FM, BARNES WA, GRAVITT PE, GREENBERG MD *et al.* ORAL CONTRACEPTIVES AS RISK FACTORS FOR CERVICAL ADENOCARCINOMAS AND SQUAMOUS CELL CARCINOMAS. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Volume 8:1079–1085, 1999.

LAUKKANEN P, KOSKELA P, PUKKALA E, DILLNER J, LÄÄRÄ E, KNEKT P *ET AL.* Time trends in incidence and prevalence of human papillomavirus type 6, 11 and 16 infections in Finland. *J Gen Virol.* 2003 Aug; 84(Pt 8):2105-9.

LEONART MS; NASCIMENTO AJ; STINGHEN AEM. Método de Papanicolau em material cérvico-vaginal para triagem de infecção por *candida sp*, *trichomonas vaginalis* e *chlamydia trachomatis*, RBAC, vol. 36(2): 111-115 2004.

LÖRINCZ AT. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J Obstet Gynaecol Res* 22(6):629-36, 1996.

LU DW, PIROG EC, ZHU X, WANG HL, PINTO KR. Prevalence and typing of HPV DNA in atypical squamous cells in pregnant women. *Acta Cytol* 47:1008-16; 2003.

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>. Acesso em 07 de maio de 2008.

MADI SRC; PAESI EP; SERAFINI SO. Determinação e tipagem do papilomavírus humano (HPV) em amostras de população feminina atendida no ambulatório de patologia cervical do ambulatório central da Universidade de Caxias do sul, Revista de Ciências Médicas da Universidade de Caxias do Sul-v.1.n:2, Caxias do Sul: Educs, 66p, 2003.

MEISELS A. Cytologic diagnosis of human papillomavirus. Influence of age and pregnancy. *Acta Cytol* 36:480-2; 1992.

MOLECULAR CLONING. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monographs* 31: 80-88, 2003.

MOSCICKI AB, SHIBOSKI S, BROERING J, POWELL K, CLAYTON L, JAY N *et al*. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr* 132:277-84; 1998.

MORALES-PEZA N, AUEWARAKUL P, JUAREZ V, GARCIA-CARRANCA A, CID-ARREGUI A. In vivo tissue-specific regulation of the human papillomavirus type 18 early promoter by estrogen, progesterone, and their antagonists. *Virology* 294:135-40; 2002.

MORRISON EA, GAMMON MD, GOLDBERG GL *et al*. Pregnancy and cervical infection with human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet* 54:125-30; 1996.

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

MUNGER K, BALDWIN A, EDWARDS KM, HAYAKAWA H, NGUYEN CL, OWENS M *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol*, v. 78, n. 21, p.11451-11460, 2004.

MURTA EFC, DE SOUZA MAH, ADAD SJ, ARAUJO JR E. Infecção pelo papilomavírus humano durante a gravidez: relação com achados citológicos. *Rev Bras Ginecol Obstet* 23:377-81; 2001.

MURRAY PR; BARON E; FALLES MA; TENOVER FC. Manual of clinical Microbiology. *Am Soc Microb*, 7° Ed.; 1999.

NGUYEN C, MONTZ FJ, BRISTOW RE. Management of stage I cervical cancer in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 55:633-43; 2000.

NONNENMACHER B, PINTOS J, BOZZETTI MC. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. *Int J STD AIDS* 14(4):258-265, 2003.

NOWAK Z, KAROWICZ-BILIŃSKA A. Human papilloma virus infection in pregnant women with normal pap-smears, HPV oncogenity and risk factors. *Ginekol Pol* 78(9):678-84, 2007.

OKADA MMK, GONÇALVES MAG, GIRALDO PC. Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus Humano (HPV). In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro de HPV – Papilomavírus Humano. São Paulo: BG Cultural; 2000.

PAKARIAN F, KAYE J, CASON J, KELL B, JEWERS R, DERIAS NW *et al.* Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, 101:514-517; 1994.

PAO CC, LIN SS, LIN CY, MAA JS, LAI CH, HSIEH TT. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol* Apr; 95(4):540-6, 1991.

PARASKEVAIDIS E, KOLIOPOULOS G, KALANTARIDOU S, PAPPA L, NAVROZOGLOU I, ZIKOPOULOS K *et al.* Management and evolution of cervical

intraepithelial neoplasia during pregnancy and postpartum. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 104:67-9; 2003.

PAYAN C, DUCANCELLE A, ABOUBAKER MH, CAER J, TAPIA M, CHAUVIN A *et al.* Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol.* Mar;45(3):897-901, 2007 .

PEREZ LA. Genital HPV: links to cervical cancer, treatment, and prevention. *Clin Lab Sci.* 2001 Summer;14(3):183-6; quiz 193.

PEYTON CL, SCHIFFMAN MS, LÖRINCZ AT, HUNT WC. Comparison of PCR- and hybrid Capture based human Papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microb* Nov; 36(11):3248-3254, 1998.

PINTO AP, BAGGIO HCC, GUEDES GB. Sexually-transmitted viral disease in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. *Brazilian Journal of infectious Disease* Vol.9 (3): 241-250, 2005.

PHILIP E CASTLE, JOAN L WALKER, MARK SCHIFFMAN, COSETTE M WHEELER. Hormonal contraceptive use, pregnancy and parity, and the risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 among oncogenic HPV DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Int J Cancer.* 2005 Dec 20;117(6):1007-12.

POLJAK M, BRENCIC A, SEME K, VINCE A, MARIN IJ. Comparative evaluation of first- and second-generation digene hybrid capture assays for detection of human papillomaviruses associated with high or intermediate risk for cervical cancer. *J Clin Microbiol* Mar;37(3):796-7, 1999.

POPPE WA, IDE PS, DRIJKONINGEN MP, LAUWERYNS JM, VAN ASSCHE FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest* Volume 39:34-38, 1995.

PROKOPCZYK B, COX JE, HOFFMANN D, WAGGONER SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* Volume 89: 868-873, 1997.

PRUSTY BK, KUMAR A, ARORA R, BATRA S, DAS BC. Human papillomavirus (HPV) DNA detection in self-collected urine. *Int J Gynaecol Obstet* Sep;90(3):223-7, 2005.

PURANEN M, YLISKOSKI M, SAARIKOSKI S, SYRJANEN K, SYRJANEN S. Vertical transmission of human papillomavirus (HPV) from infected mothers to their newborn babies and persistence of the virus in childhood. *Am J Obstet Gynecol* 174:694-9; 1996.

PURANEN MH, YLISKOSKI MH, SAARIKOSKI SV, SYRJANEN KJ, SYRJANEN SM. Exposure of infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol* 176:1039-45; 1997.

RUFFIN MT 4TH, BAILEY JM, ROULSTON D, LEE DR, TUCKER RA, SWAN DC, UNGER ER. Human papillomavirus in amniotic fluid. *BMC Pregnancy Childbirth* Sep 4;6:28, 2006.

SALVATORE VACCARELLA, ROLANDO HERRERO, MIN DAÍ, PETER JF SNIJDERS, CHRIS JLM, MEIJE RM *et al.* Reproductive Factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys and IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(11). November 2006.

SCHWARTZ DB, GREENBERG MD, DAOUD Y, REID R. Genital condylomas in pregnancy: use of trichloroacetic acid and laser therapy. *Am J Obstet Gynecol* 158:1407-16; 1988.

SCHEURER ME, TORTOLERO-LUNA G, ADLER-STORTHZ K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Sep-Oct;15(5):727-46.

SCHIFFMAN M, CASTLE PE, JERONIMO J, RODRIGUEZ AC, WACHOLDER S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007 Sep 8;370(9590):890-907.

SCHNEIDER A, HOTZ M, GISSMANN L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 40:198-201; 1987.

SEDLACEK TV, LINDHEIM S, EDER C, HASTY L, WOODLAND M, LUDOMIRSKY A *et al.* Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. *Am J Obstet Gynecol* 161:55-9; 1989.

SETHI S, MULLER M, SCHNEIDER A, BLETTNER M, SMITH E, TUREK L *et al.* Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 178:360-4; 1998.

SHAH K, KASHIMA H, POLK BF, SHAH F, ABBEY H, ABRAMSON A. Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 68:795-9; 1986.

SIDDIQUI G, KURZEL RB, LAMPLEY EC, KANG HS, BLANKSTEIN J. Cervical dysplasia in pregnancy: progression versus regression post-partum. *Int J Fertil Womens Med* 46:278-80; 2001.

SMITH EM, JOHNSON SR, JIANG D, ZLESKI S, LYNCH CF, BRUNDAGE S *et al.* The association between pregnancy and human papillomavirus prevalence. *Cancer Detect Prev* 15:397-402; 1991.

SMITH EM, LEVY BT, RITCHIE JM, JIA J, WANG D, HAUGEN TH *et al.* Is use of hormone replacement therapy associated with increased detection of human papillomavirus and potential risk of HPV-related genital cancers? *Eur J Cancer Prev.* Jun;11(3):295-305, 2002.

SMITH EM, RITCHIE JM, YANKOWITZ J, SWARNAVEL S, WANG D, HAUGEN TH, TUREK LP. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: concordance and modes of transmission. *Sex Transm Dis* 31:57-62; 2004.

SMITS PH, BAKKER R, JONG E, MULDER JW. High Prevalence of human papillomavirus infections in urine sample from human immunodeficiency virus-infected men. *J Clin Microb* 5936-5939, 2005.

SINAL SH, WOODS CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005 Oct;16(4):306-16.

SOARES VR, NIEMINEN P, AHO M, VESTERINEN E, VAHERI A, PAAVONEN J. Human papillomavirus DNA in unselected pregnant and non-pregnant women. *Int J STD AIDS* 1:276-8; 1990.

SPERHACKE RD, MELLO FC, ZAHA A, KRITSKI A, ROSSETTI ML. Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. *Int J Tuberc Lung Dis* Mar;8(3):312-7, 2004.

SYRJÄNEN S, PURANEN M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):259-74.

SYRJÄNEN K, SHABALOVA I, PETROVICHEV N, KOZACHENKO V, ZAKHAROVA T, PAJANIDI J *et al*. Oral contraceptives are not an independent risk factor for cervical intraepithelial neoplasia or high-risk human papillomavirus infections. *Anticancer Res*. 2006 Nov-Dec;26(6C):4729-40.

STEBEN M, DUARTE-FRANCO E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2-5

SWEET RL, GIBBS RS. Sexually transmitted diseases. Infectious Diseases of the Female Genital Tract - 4th ed. RL Sweet & RS Gibbs (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 155-165, 2002.

TÁBORA N, ZELAYA A, BAKKERS J, MELCHERS WJ, FERRERA A. Chlamydia trachomatis and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jul;73(1):50-3.

TAMIM H, FINAN RR, SHARIDA HE, RASHID M *et al*. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* Aug; 43(4): 277-281, 2002.

TENTI P, ZAPPATORE R, MIGLIORA P, SPIRILLO A, MACCARINI U, DE BENEDITTIS M *et al*. Latent human papillomavirus infection in pregnant women at term: a case-control study. *J Infect Dis* 176:277-80; 1997.

TENTI P, ZAPPATORE R, MIGLIORA P, SPINILLO A, BELLONI C, CARNEVALI L. Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infection. *Obstet Gynecol* 93:475-9; 1999.

TROTTIER H, FRANCO EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S1-15.

TSENG CJ, LIN CY, WANG RL, CHEN LJ, CHANG YL, HSIEH TT *et al*. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol* 166:35-40; 1998.

ULLRICH SJ, ANDERSON CW, MERCER WE, APPELLA E. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 267:15259-15262; 1992.

VILLA LL, SICHERO L, RAHAL P, CABALLERO O. Molecular variants of human papillomavirus humano tipos 16 e 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Med Virol* 58(81):2959-2968, 2000.

ZOUNDI-OUANGO O, MORCEL K, CLASSE JM, BURTIN F, AUDRAIN O, LEVÊQUE J. Uterine cervical lesions during pregnancy: diagnosis and management. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* May;35(3):227-36, 2006.

ZÜR HAUSEN H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;(186):131-156.

XI LF, KOUTSKY LA, GALLOWAY DA, KUYPERS J. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1997 Jun 4; 89(11):796-802.

WARFORD A, CHERNESKY M, PETERSON EM. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2003. P. 2-18.

WATTS DH, KOUTSKY LA, HOLMES KK, GOLDMAN D, KUYPERS J, KIVIAT NB *et al*. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 178:365-73; 1998.

YOSHINOUCHI M, HONGO A, NAKAMURA K, KODAMA J, ITOH S, SAKAI H *et al.*
Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in
cervical cancers. *J Clin Microbiol* Nov 37(11):3514-7, 1999.

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](#)