



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA  
Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DO GENOMA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM  
ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS, COM IDADES ENTRE 18 E 25  
ANOS, DA REGIÃO DE SÃO LUÍS DE MONTES BELOS – GOIÁS**

ROSÂNGELA NAZARETH PEREIRA

ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi  
CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves

GOIÂNIA-GO  
2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA  
Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DO GENOMA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM  
ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS, COM IDADES ENTRE 18 E 25  
ANOS, DA REGIÃO DE SÃO LUÍS DE MONTES BELOS – GOIÁS**

ROSÂNGELA NAZARETH PEREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi.

GOIÂNIA-GO

2011

P436d Pereira, Rosângela Nazareth.  
Detecção do genoma do papilomavirus humano em  
estudantes universitárias, com idades entre 18 e 25 anos, da região  
de São Luís de Montes Belos – Goiás [manuscrito] / Rosângela  
Nazareth Pereira. – 2011.  
72 f.

Bibliografia : f. 55-68  
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2011.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi.  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves.  
Inclui lista de tabelas, figuras, quadros.  
Inclui, Apêndice  
Inclui Anexo

1. HPV – estudantes universitárias – incidência – São Luís  
dos Montes Belos (GO). 2. Câncer de colo de útero. 3. Doenças  
sexualmente transmissíveis. I. Título.

CDU: 616.98(817.3São Luís de Montes Belos)(043.3)



**PUC  
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário  
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010  
Goiânia ● Goiás ● Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA EM 27 DE ABRIL DE 2011 E APROVADA  
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA  
9,5 (nove e meio)

*Vera Aparecida Saddi*

Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás  
(presidente orientadora)

*Rosane Ribeiro Figueiredo Alves*

Dr<sup>a</sup>. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves - UFG  
(co-orientadora)

*Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva*

Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva – PUC Goiás  
(membro interno)

*Silvia Helena Rabelo dos Santos*

Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Rabelo dos Santos - UFG  
(membro externo)

Dedico este trabalho ao meu pai, Galeno, exemplo de vida. Agradeço a Deus pela felicidade de ser sua filha. À minha mãe, Cidinha, por seu amor incondicional, conselheira, presente em todos os momentos de minha vida. Ao meu esposo, Domingos, pelo amor e paciência. Sem você eu não teria conseguido. Aos meus filhos, Heitor e Lara, pelo apoio e incentivo. Espero poder recompensá-los, algum dia, de alguma forma, a minha ausência.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Aparecida Saddi, minha orientadora, a quem eu muito admiro, agradeço pelo incentivo, dedicação e pelo exemplo de profissionalismo e competência.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves, pela co-orientação, atenção e disponibilidade em todos os momentos.

Ao Dr. Domingos Ribeiro Casimiro, pelo auxílio nas coletas ginecológicas das pacientes deste estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Helena Rabelo e colaboradores do Laboratório Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás pelo estudo dos esfregaços citológicos.

Às acadêmicas da Faculdade Montes Belos, em São Luís de Montes Belos, que gentilmente concordaram em participar deste estudo.

A toda minha família pelo amor, apoio e compreensão.

## RESUMO

**Introdução:** A infecção pelo papilomavírus humano (HPV), com maior prevalência entre as mulheres jovens, é considerada a infecção de transmissão sexual mais freqüente em todo o mundo. O papel fundamental desta infecção na carcinogênese cervical foi estabelecido. **Objetivos:** Estimar a prevalência e identificar os fatores associados à infecção pelo HPV e às anormalidades citológicas em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade, na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás. **Método:** Estudo de corte transversal conduzido na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás, incluindo 107 estudantes universitárias. Os dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica foram obtidos por meio de um questionário. Em seguida as estudantes foram submetidas a exame ginecológico com coleta de espécime biológico cervical para análise citológica e molecular. A classificação citológica foi baseada no sistema de Bethesda. A detecção do genoma do HPV foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11. Para análise de dados foi utilizado o programa de análise estatística Epi Info versão 3.5.1. Os dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica foram analisados por estatística descritiva. Foi realizada análise univariada com cálculo do Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e nível de significância estatística de 5%. **Resultados:** A prevalência da infecção pelo HPV foi de 39,3% (IC 95%: 30,0-49,2). Os fatores associados à infecção pelo HPV, na amostra estudada, foram o início da atividade sexual até os 15 anos de idade (OR: 2,7, IC95%: 1,1-6,7) e o número de parceiros sexuais acima de três (OR: 2,4, IC95%: 0,9-6,3). A prevalência de anormalidades citológicas foi de 3,7% (IC95%: 1,0-9,3) e nenhum dos fatores avaliados mostrou associação estatisticamente significativa com a ocorrência destas anormalidades. **Conclusões:** Os resultados deste estudo mostraram uma elevada prevalência da infecção pelo HPV. Os fatores significativamente associados à infecção pelo HPV foram o início da atividade sexual até os 15 anos de idade e o número de parceiros sexuais acima de três.

**Palavras chave:** HPV, Reação em Cadeia da Polimerase, Citologia, Câncer do Colo do Útero.

## ABSTRACT

**Introduction:** Human papillomavirus (HPV) infections are highly prevalent among young women and they are considered the most prevalent sexually transmitted infection worldwide. The relationship between cervical carcinogenesis and HPV is well established. **Objectives:** to study the prevalence of HPV infection and possible risk factors associated with HPV infection and cytopathological abnormalities in a group of university students, aged from 18 to 25 years old, from a Central area in Brazil. **Methods:** a cross-sectional study was developed in São Luis de Montes Belos, Goiás, Brazil, and it comprised 107 university students. Socio-demographic, behavioural, sexual related and obstetrical data were obtained from all the students by responding a questionnaire. The students were subjected to gynecological examination and to collection of cervical specimens for cytological and molecular analysis. The Bethesda Cytology Classification was used for the evaluation of cytological abnormalities. **Results:** the prevalence of HPV infection was 39.3% (95%CI: 30, 0-49.2). HPV infection was significantly associated with the age under 15 years old at the first intercourse (OR: 2.7; 95%CI: 1.1-6.7), and with three or more sexual partners during sexual life (OR: 2.4; 95%CI: 0.9-6.3). The prevalence of cytological abnormalities was 3.7% and none of the examined factors were significantly associated with the presence of such abnormalities. **Conclusions:** The results of our study demonstrated a high prevalence of HPV infection in young Brazilian women. First intercourse before the age of 15 years old, and the history of more than three sexual partners during lifetime were significantly associated to HPV infection.

**Keywords:** HPV, Polymerase Chain Reaction, cervical cytology, cervical cancer

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Prevalência do HPV em jovens universitárias.....	22
<b>TABELA 2:</b> Características sócio-demográficas, de comportamento sexual e antecedente de gravidez das 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás. ....	40
<b>TABELA 3:</b> Análise univariada dos potenciais fatores associados à infecção pelo HPV em 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás. ....	41
<b>TABELA 4:</b> Análise univariada dos potenciais fatores associados às anormalidades citológicas em 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás. ....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Esquema representativo do genoma do HPV 16 .....	16
<b>FIGURA 2:</b> Árvore filogenética do papilomavírus .....	18
<b>FIGURA 3:</b> Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero) .....	19
<b>FIGURA 4:</b> Etapas do ciclo de infecção e replicação do HPV .....	26
<b>FIGURA 5:</b> Fatores de risco envolvidos na história natural das infecções pelo HPV e neoplasia do colo uterino .....	27
<b>FIGURA 6:</b> Testes moleculares e grau de sensibilidade.....	31

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1:</b> Classificação epidemiológica dos tipos de HPV .....	18
<b>QUADRO 2:</b> Classificação das lesões cervicais de acordo com o sistema de Bethesda de 2001 .....	28
<b>QUADRO 3:</b> Protocolo de PCR para amplificação do gene constitutivo de GAPDH .....	36
<b>QUADRO 4:</b> Protocolo de ciclagem.....	37
<b>QUADRO 5:</b> Seqüência do <i>primer</i> PGMY09/11 .....	38

## LISTA DE ANEXO

<b>ANEXO 1:</b> Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa .....	63
---	----

## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE 1:</b> Termo de consentimento livre e esclarecido.....	65
<b>APÊNDICE 2:</b> Questionário.....	69
<b>APÊNDICE 3:</b> Protocolo para extração de DNA .....	70
<b>APÊNDICE 4:</b> Protocolo para Gel de Poliacrilamida a 8% e coloração do gel por Nitrato de Prata .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGC** – Atipia de células glandulares.
- AIDS** – Síndrome da imunodeficiência adquirida.
- ASC-H** - Células escamosas atípicas – não é possível excluir uma lesão intraepitelial de alto grau.
- ASC-US** - Células escamosas atípicas de significado indeterminado.
- CH** – Captura híbrida.
- CHII** – Captura híbrida II.
- CPF** – Cadastro de pessoa física.
- DNA** – Ácido desoxi-ribonucléico.
- DST** – Doença sexualmente transmissível.
- E: EARLY** - Região que codifica proteínas expressas precocemente.
- GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase.
- HIS** - Hibridização in situ.
- HPV** – Papilomavírus humano.
- HSIL** - do inglês: *high grade squamous inthraepithelial lesion*.
- INCA** – Instituto Nacional do Câncer.
- L: LATE** - Região que codifica proteínas expressas tardiamente.
- LB** – do inglês: *Line blot*.
- LCR** – do inglês: *long control region*.
- LSIL** - do inglês: *low grade squamous inthraepithelial lesion*.
- NIC** - neoplasia intraepitelial cervical.
- OD** – Odds ratio.
- ORFS** – do inglês: *open reading frames*.
- PA** – Pureza analítica.
- PCR** – do inglês: Polymerase Chain reaction (Reação em cadeia da polimerase).
- PSF** – Programa de Saúde da Família
- RG** – Registro geral.
- RNA** – Ácido ribonucléico.
- RPM** – Rotações por minuto.
- TBE** – Tampão tris-borato-EDTA.
- TEMED** – Tetrametiletilenodiamina.
- URR** – do inglês: *upstream regulatory region*.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO HPV .....	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL .....	18
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV .....	20
1.4 HPV EM MULHERES JOVENS .....	21
1.5 FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO PELO HPV E PARA O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES .....	23
1.6 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV .....	25
1.7 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVAS</b> .....	<b>32</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
4.1 DESENHO DO ESTUDO .....	34
4.2 ENCAMINHAMENTO E APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	34
4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES .....	34
4.4 COLETA DE ESPÉCIMES CERVICO-VAGINAIS .....	34
4.4.1 Critérios de inclusão .....	35
4.4.2 Critérios de exclusão .....	35
4.5 EXAME CITOLÓGICO DO MATERIAL CÉRVICO-VAGINAL .....	35
4.6 DETECÇÃO MOLECULAR DO GENOMA DO HPV NOS ESPÉCIMES ENDORCERVICAIS UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR .....	36
4.6.1 Análise da qualidade do DNA extraído por meio de amplificação de um segmento do gene GAPDH: .....	36
4.6.2 Detecção do genoma viral utilizando os oligonucleotídeos iniciadores consensuais PGMY09/11: .....	37
4.6.3 Processamento e análise de dados: .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>49</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>62</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), com maior prevalência entre as mulheres jovens, com vida sexual ativa (Diógenes *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2008) é considerada a infecção de transmissão sexual mais frequente e sua incidência está aumentando em todo o mundo (Koutsky, 1997). A atividade sexual é o principal meio de transmissão da infecção, com valores próximos a 80% em uma única relação sexual (Tiago, 2001). Embora as relações sexuais com penetração sejam importantes na transmissão, admite-se que a aquisição do HPV possa ocorrer também através de contatos sexuais sem penetração (Lipsy, 2008).

Vários estudos demonstraram que dentre os fatores de risco associados à infecção pelo HPV, a idade jovem, o início precoce da vida sexual e a existência de vários parceiros sexuais ao longo da vida figuram como os mais expressivos (Herrero *et al.*, 1989; Kahn *et al.*, 2002; Cavalcanti & Carestiatto 2006; Campos *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008).

O exame citológico de Papanicolaou é recomendado como método de rastreamento de grandes populações a fim de detectar lesões pré-malignas e malignas. A nomenclatura para emissão de laudos citopatológicos mais aceita atualmente é o Sistema Bethesda (Solomon *et al.*, 2002). O câncer cervical é um raro resultado da infecção pelo HPV, pois a maioria dos casos de infecção pelo HPV permanece assintomática, subclínica e transitória (INCA, 2010).

Os HPV são classificados epidemiológica e filogeneticamente em tipos de baixo risco, provavelmente de alto risco e de alto risco oncogênico (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004). A infecção persistente por tipos de alto risco oncogênico, quando associados a outros cofatores, predispõe ao desenvolvimento do câncer do colo uterino e suas lesões precursoras, as denominadas citologicamente lesões intraepiteliais escamosas (Solomon *et al.*, 2002; Franco, 2003; Diógenes *et al.*, 2006). Os HPV de alto risco, especificamente HPV 16 e HPV 18, são os tipos mais freqüentemente associados ao carcinoma cervical no mundo (Gnanamony *et al.*, 2007; Beaudenon & Huibregtse, 2008), sendo o HPV 16 predominante no carcinoma de células escamosas e o HPV 18 nos adenocarcinomas (Souza, 2004).

A infecção pelo HPV é o fator etiológico do câncer de colo uterino, detectado em 99,7% dos casos (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999). Este

câncer é o segundo mais comum entre as mulheres, com incidência de aproximadamente 500 mil casos novos por ano e taxa de mortalidade de 230 mil mulheres por ano, no mundo. O câncer do colo do útero pode ocorrer na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (INCA, 2010).

O progresso das técnicas de biologia molecular tem possibilitado uma melhor condição de pesquisas para a caracterização das partículas virais e seus mecanismos de infecção e patogênese no organismo humano. Tem também permitido o diagnóstico mais preciso pois possibilita uma definição dos diferentes tipos de HPV nas lesões, a fim de traçar o risco real de oncogênese numa dada população, permitindo assim, elaborar medidas eficientes para a prevenção do câncer (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

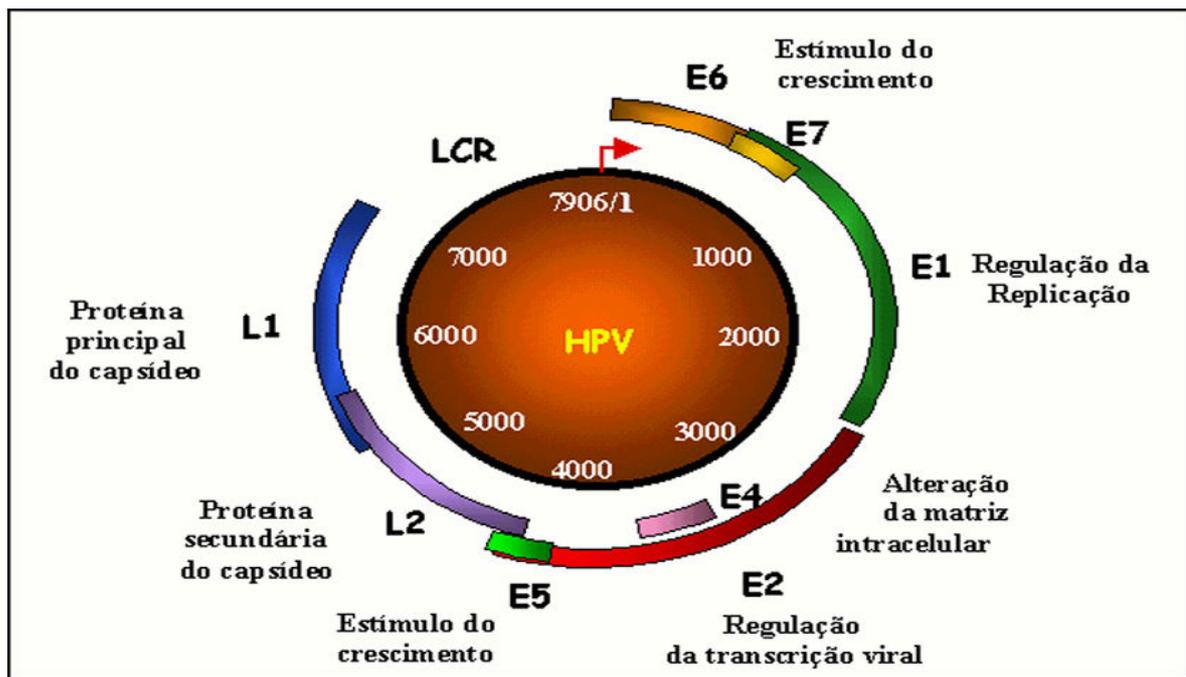
Com o avanço da tecnologia e o advento de técnicas moleculares, a detecção de HPV tornou-se cada vez mais precisa o que permite correlacionar o vírus ao desenvolvimento de câncer. Dentre as técnicas mais recentes, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser um método de extrema eficácia, favorecendo uma detecção mais sensível e específica para os diversos tipos de HPV (Souto *et al.*, 2005).

## 1.1 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DO HPV

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae*, incluída no gênero *alpha-papilomavirus* (de Villiers *et al.*, 2004). O genoma do HPV é constituído por uma dupla fita de DNA circular, com 7.900 pares de bases e peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  daltons. O capsídeo viral é composto de 72 subunidades (capsômeros) organizadas em estruturas icosaédricas com diâmetro de 55 nm (Brown & Fife, 1990; Chang, 1990; Arends *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2007).

Os HPV são vírus não cultiváveis e a dificuldade do cultivo advém do fato desses vírus se replicarem somente nas camadas basais do epitélio, constituídas por células menos diferenciadas, onde também ocorre a expressão das proteínas precoces. Entretanto, a replicação vegetativa do DNA viral, a síntese das proteínas do capsídeo (proteínas tardias) e a montagem das partículas virais só têm lugar nas células em diferenciação terminal (Villa, 1995; Muñoz *et al.*, 2006). O HPV apresenta considerável tropismo pelo tecido epitelial pavimentoso da pele e das mucosas (Castro *et al.*, 2004).

Mutações e recombinações no genoma do HPV são eventos muito raros (de Villiers *et al.*, 2004). O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões: uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), uma região que codifica proteínas expressas precocemente E (*early*) e uma região que codifica proteínas expressas tardiamente L (*late*) durante a infecção (de Villiers *et al.*, 2004; Rogazy, 2007; Wolschick *et al.*, 2007; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008). Os genes precoces codificam proteínas implicadas na transcrição e replicação viral, bem como na proliferação e transformação das células infectadas (Mendonça & Netto, 2005). A região longa de controle da expressão gênica (LCR) está localizada entre as regiões L1 e E6 e regula a transcrição dos genes da região precoce. O mapa do genoma do HPV 16 é considerado o protótipo de todos os genomas de HPV (Villa, 1997) e encontra-se descrito na figura 1.



**FIGURA 1.** Esquema representativo do genoma do HPV 16  
 FONTE: Modificado de Villa, 1997.

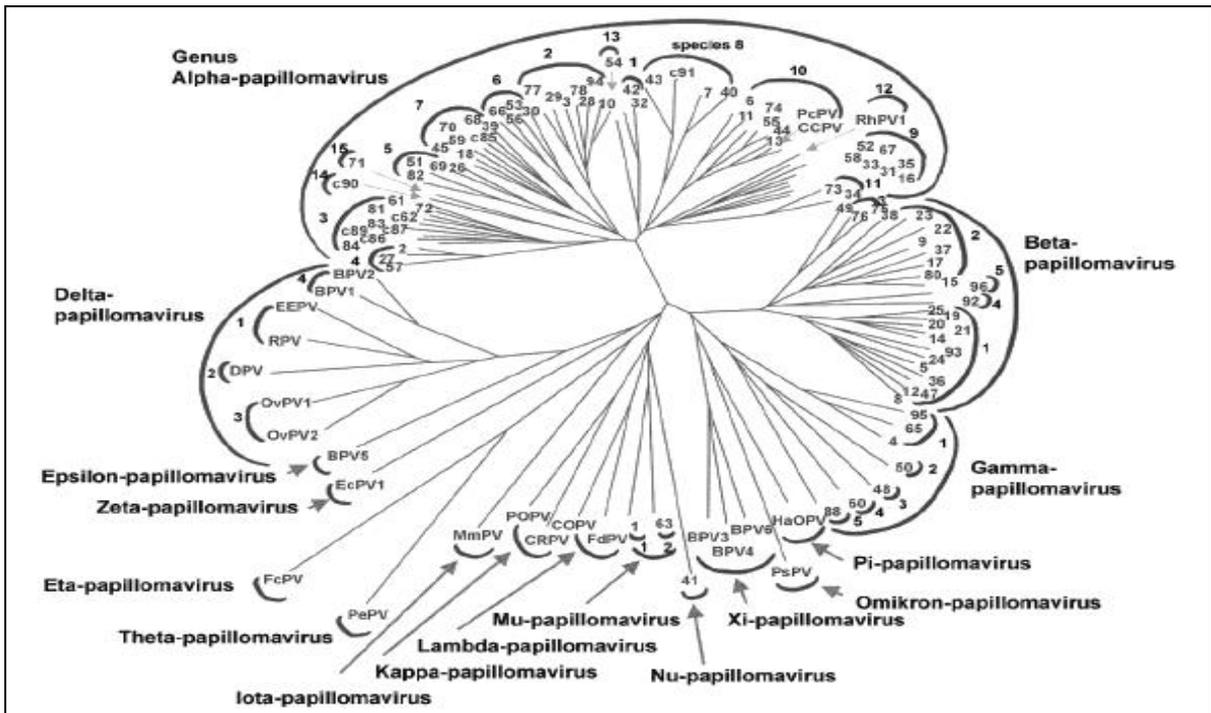
Somente uma das fitas do genoma circular do HPV é ativamente transcrita (Castro & Bussoloti Filho, 2006), uma vez que todos os genes virais, ou unidades de tradução, ORFs (*Open Reading Frames*) estão localizados na mesma fita de DNA (Villa, 1995). O genoma do HPV é constituído por dez ORFs. As ORFs E1, E2, L1 e L2 são bem conservadas entre todas as espécies da família. A ORF L1 é o gene mais conservado e por isso, o mais usado na classificação de novos tipos do vírus (de Villiers *et al.*, 2004).

As funções das proteínas precoces dos HPV são frequentemente investigadas. A proteína E1 associa-se com a replicação viral, E2 com a regulação da transcrição e replicação do genoma viral (de Villiers *et al.*, 2004; Souza, 2004; Garnett & Duerksen-Hughes, 2006; Gnanamony *et al.*, 2007; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008) e E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular, promovendo o colapso da rede de queratina da célula, que leva à desintegração do epitélio e liberação de partículas virais infectantes. A proteína E4 é o produto predominante da infecção viral produtiva e, por interagir com a citoqueratina, talvez esteja relacionada às alterações estruturais do citoplasma das células infectadas, levando à formação dos coilócitos (Souza, 2004).

As proteínas E5, E6 e E7 estão envolvidas na transformação celular e induzem a proliferação celular (E5) e a carcinogênese (E6 e E7). Acredita-se que a expressão das proteínas E6 e E7 esteja intimamente relacionada ao início e à manutenção do processo de carcinogênese cervical (de Villiers *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2005; Wolschick *et al.*, 2007; Gnanamony *et al.*, 2007; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008). As proteínas E6 e E7 do HPV são capazes de interagir com proteínas que regulam o ciclo celular e que atuam como supressoras de tumores, tais como a p53 e pRb. Essa interação resulta na degradação e inativação das proteínas celulares, o que conduz à transformação, imortalização celular, e posteriormente, à formação de neoplasias (de Villiers *et al.*, 2004).

Mais de 200 tipos de HPV já foram descritos na literatura (Novaes *et al.*, 2002; de Villiers *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2006). Cerca de 118 tipos já foram identificados, isolados e completamente seqüenciados, dos quais aproximadamente 40 infectam o trato genital inferior (de Villiers *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004; Bernard, 2005). Dependendo da semelhança na seqüência dos nucleotídeos no genoma viral, os HPV estão classificados em tipos, subtipos e variantes virais (Franco, 2003). Atualmente, considera-se um novo tipo de HPV quando as seqüências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 diferem em mais de 10% dos tipos conhecidos. Se esse percentual for menor que 2%, então, o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas cujas seqüências nucleotídicas nessas regiões gênicas diferem entre 2% e 10% dos tipos já descritos (Burd, 2003; de Villiers *et al.*, 2004). Os tipos são designados por números e os subtipos por letras, seguindo uma ordem cronológica em relação a sua descrição (Rogazy, 2007).

O gênero alfa-papilomavírus agrupa 15 espécies biologicamente semelhantes. As espécies 5, 6, 7 e 9 contêm os tipos de HPV considerados como de alto risco oncogênico pela sua associação com o câncer cervical. Cinco tipos de HPV são membros da espécie 7 (HPV 18, 39, 45, 59 e 68) e sete da espécie 9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 e 67) (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2006; Garnett & Duerksen-Hughes, 2006), como descrito na figura 2 e quadro 1.



**FIGURA 2:** Árvore filogenética do papilomavírus  
 FONTE: de Villiers *et al.*, 2004.

Classificação filogenética	Classificação Epidemiológica	
	Alto risco	Baixo risco
<b>Alto risco</b>	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82, 26,* 53,* 66*	70
<b>Baixo risco</b>	73	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, CP6108

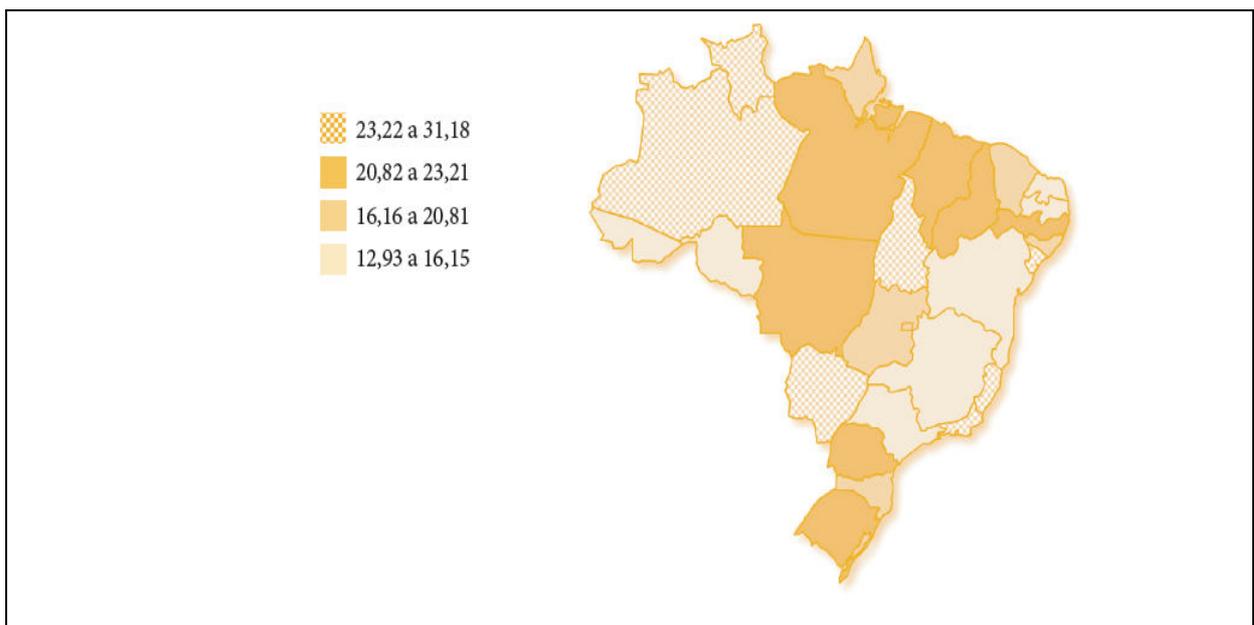
**QUADRO 1:** Classificação epidemiológica dos tipos de HPV  
 FONTE: Muñoz *et al.*, 2003.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER CERVICAL

Está bem estabelecido que a infecção pelo HPV é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer do colo de útero (Bosch *et al.*, 1995; Koutsky, 1997; Walboomers *et al.*, 1999).

Os fatores que contribuem para a ocorrência rara de câncer do colo do útero após a infecção pelo HPV diferem de população para população (Flores *et al.*, 2008). O câncer cervical é o segundo tipo de tumor mais comum entre mulheres no mundo (Koutsky, 1997; Nyári *et al.*, 2001; Diógenes *et al.*, 2006; Garnett & Duerksen-Hughes, 2006; Dehn *et al.*, 2007; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008) e o primeiro em alguns países em desenvolvimento, onde a incidência é de aproximadamente 40/100.000 mulheres (Nyári *et al.*, 2001). Estima-se que 80% dos 471.000 novos casos de câncer do colo uterino diagnosticados anualmente em todo o mundo ocorram em países menos desenvolvidos (Al-Daraji *et al.*, 2009).

No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer cervical representa a terceira neoplasia mais comum e a quarta maior causa de morte entre as mulheres com incidência estimada de 18,43 casos novos por 100.000 mulheres no ano de 2010, com risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, é o mais incidente na Região Norte, com risco de 23 casos a cada 100 mil mulheres. Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000) ocupam a segunda posição e nas regiões Sul e Sudeste, a terceira. Os estados do Amazonas, Tocantins e Mato Grosso do Sul apresentam as maiores taxas de incidência estimadas de 31,18, 28,03 e 25,46 por 100.000 mulheres, respectivamente. Em Goiás, a estimativa de incidência chega a 17,58 por 100.000 mulheres (INCA, 2010).



**FIGURA 3:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero)  
 FONTE: INCA, 2010).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) representam um grave problema de saúde pública no mundo e a epidemiologia das DST varia em grande extensão em diferentes países e em diferentes populações de um mesmo país (Nyári *et al.*, 2001). A infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais comum no mundo (Koutsky, 1997).

De maneira geral, a prevalência das infecções pelo HPV em mulheres no mundo varia de 2 a 44%, devido às diferenças nas faixas etárias das populações estudadas, ao comportamento sexual diversificado e à sensibilidade dos métodos de diagnóstico utilizados para a detecção da infecção pelo HPV (Bosch & de Sanjosé, 2003; Pereira *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2008). Cerca de 6,2 milhões de novas infecções pelo HPV ocorrem todo ano nos Estados Unidos e, atualmente, cerca de 20 milhões de indivíduos encontra-se infectados (Ault, 2006; Dehn *et al.*, 2007).

Embora estudos epidemiológicos mostrem que a infecção pelo HPV é muito comum somente uma pequena fração (entre 3% a 10%) das mulheres infectadas com um tipo de HPV de alto risco desenvolverá câncer do colo do útero (INCA, 2010).

Durante todo o período de vida, estima-se que aproximadamente 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV (Koutsky, 1997; Queiroz *et al.*, 2007), especialmente nos primeiros quatro anos após tornarem-se sexualmente ativos (Sheary & Dayan, 2005).

A infecção pelo HPV é mais comum em indivíduos jovens e sexualmente ativos (Brown *et al.*, 2005; Alves, 2006), apresentando dois picos de prevalência: um mais elevado em mulheres jovens, com queda gradual com a idade, e outro entre a quarta e quinta décadas de vida. Esse segundo pico reflete a perda da imunidade original contra o vírus, ao qual esteve exposta em idade mais jovem (Franco & Harper, 2005). A menor prevalência da infecção pelo HPV em mulheres após a terceira ou quarta década de vida estaria relacionada à transitoriedade da infecção pelo HPV e à menor incidência da infecção nesta faixa etária, por menor exposição e/ou aquisição de imunidade (Burk *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 2002).

O tipo de HPV associado ao câncer do colo uterino e às infecções genitais apresenta variações geográficas. O HPV 16 é o responsável pela maior

proporção de casos (50%) (Bosch *et al.*, 1995; Ault, 2006). Na América Central e América do Sul, os cinco tipos de HPV mais prevalentes são o: 16, 18, 45, 59, 31 e 33. No Brasil, o HPV-16 é o mais prevalente em todas as regiões, todavia, variações são descritas em relação aos outros tipos. O HPV 18 é o segundo tipo mais prevalente nas regiões Norte, Sudeste e Sul, enquanto que os HPV 31 e 33 representam os segundos tipos mais prevalentes na região Nordeste e Central (Rabelo-Santos *et al.*, 2003; Queiroz *et al.* 2007).

Os HPV oncogênicos dos tipos 16 e 18 são detectados em aproximadamente 76% dos casos de NIC (neoplasia intraepitelial cervical) de alto grau e câncer cervical nos Estados Unidos, enquanto que os HPV dos tipos 6 e 11 estão associados com 10% dos casos de lesões de baixo grau e 90% dos casos de verrugas genitais (Lipsy, 2008).

#### **1.4 HPV EM MULHERES JOVENS**

De modo geral, uma vulnerabilidade biológica às infecções sexualmente transmissíveis é reconhecida em mulheres jovens. A ectopia cervical, que também é freqüente nesta fase evolutiva, induz à metaplasia, um mecanismo natural de reparação, favorecendo a transmissão do HPV e de outros microrganismos (Moscicki, 1998).

Mulheres jovens apresentam risco significativamente maior de desenvolver infecção pelo HPV do que mulheres mais velhas (Johnson, 1995). A prevalência da infecção pelo HPV em mulheres jovens está relacionada, principalmente, ao comportamento sexual (Sarian *et al.*, 2003). Mais de 50% das adolescentes e adultas jovens adquirem a infecção pelo HPV nos primeiros quatro ou cinco anos após o início da atividade sexual (Moscicki *et al.*, 2001). As maiores prevalências são encontradas em mulheres abaixo dos 25 anos (Nyári *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2003; Rama *et al.*, 2008), com taxas variando entre 20% a 46% (Ault, 2006; Dehn *et al.*, 2007; de Sanjosé *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2008; Hoory *et al.*, 2008).

Variações geográficas na prevalência do HPV e distribuição de genótipos foram descritos em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil. Porém, os dados sobre a prevalência da infecção pelo HPV em adultas jovens, sexualmente ativas, com idades entre 18 e 25 anos, ainda são limitados. Uma revisão da literatura internacional mostra que a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres jovens

varia de 8,6 a 57,1% (tabela 1). Esta faixa de variação é justificada pelo método de detecção empregado, pelas características socioeconômicas e pelo comportamento sexual da população estudada. Com base nos estudos revisados, o HPV 16 foi o tipo mais prevalente dentre os HPV de alto risco oncogênico e a maior prevalência (57,1%) foi observada em mulheres gregas com idades entre 16 e 20 anos (Stamataki *et al.*, 2010).

Os estudos que avaliaram a prevalência do HPV em jovens universitárias apresentaram resultados variando entre 15,2 e 52,65% (tabela 1). No Brasil, um único estudo avaliou a prevalência de infecção pelo HPV em relação ao grau de escolaridade, demonstrando resultados positivos para 24,5% das universitárias. Este estudo demonstrou uma associação mais significativa para a infecção pelo HPV em mulheres com maior escolaridade comparadas às de menor escolaridade. Uma explicação para esse fato poderia ser que as mulheres com maior escolaridade teriam mais acesso à informação e aos exames de prevenção para esta infecção (Nonnenmacher *et al.*, 2002).

**TABELA 1:** Prevalência do HPV em jovens universitárias.

Referência Bibliográfica	Localização geográfica	Faixa etária / média de idade (anos)	Método detecção	HPV %
Kjaer <i>et al.</i> , 1997	Copenhag, Dinamarca	20 a 29 Média = 25	PCR GP5/GP6	15,4% 19,4% (20 a 23 anos)
Sellers <i>et al.</i> , 2000	Ontario, Canadá	15 a 24	CHII	15,7% (15 a 19 anos) 24% (20 a 24 anos)
Nonnenmacher <i>et al.</i> , 2002	Porto Alegre, RS	≤24	CHII + PCR MY 09/11	27,9%
Winer <i>et al.</i> , 2003*	Washington	18 a 20	PCR	19,7%
Richardson <i>et al.</i> , 2003*	Montreal, Canadá	17 a 42 Média = 23	PCR MY09/11	52,65%
Souza, 2004	Porto Alegre, São Paulo, Campinas, Fortaleza e Curitiba	15 a 25 Média = 20,3	PCR SPF10	38,5%
Cuschieri <i>et al.</i> , 2004	Edinburgh, Escócia	<25	PCR GP5+/GP6+	42%
Carvalho <i>et al.</i> , 2005	Rio de Janeiro, RJ	11 a 30	CH	46,3% (11 a 20 anos) 50,4% (21 a 30 anos)
Manhart <i>et al.</i> , 2006	Estados Unidos	18 a 25	PCR MY 09/11	26,9%
Dunne <i>et al.</i> , 2007	Estados Unidos	14 a 24	PCR PGMY09/11	24,5% (14 a 19 anos) 44,8% (20 a 24 anos)
Datta <i>et al.</i> , 2008	Delhi, North India	16 a 24	CHII + PCR PGMY09/11	8,6%
Ho <i>et al.</i> , 2008*	New Brunswick, New Jersey	Média = 20±3	PCR	26%
Lenselink <i>et al.</i> , 2008	Holanda	18 a 29	PCR SPF10	19%

Cont.

Referência Bibliográfica	Localização geográfica	Faixa etária / média de idade (anos)	Método detecção	HPV %
Oh <i>et al.</i> , 2008*	Busan, South Korea	17 a 26	PCR SPF10	15,2%
Rama <i>et al.</i> , 2008	São Paulo e Campinas, SP	≤25	CHII	27,1%
Fernandes <i>et al.</i> , 2008	Natal, RN	15 a 30	PCR	33,3% (≤20 anos) 43,7% (21 a 30 anos)
Dursun <i>et al.</i> , 2009	Ankara, Turquia	20 a 29	PCR GP5/GP6	28,8%
Stamatakis <i>et al.</i> , 2010	Grécia	16 a 30	PCR	57,1% (16 a 20 anos) 26,6%(21 a 30 anos)
Oliveira <i>et al.</i> , 2010	Niterói, RJ	14 a 26 Média = 19,6	PCR MY 09/11	27,4%

\* Estudos em universitárias.

Uma conclusão comum dos diversos estudos que avaliam a prevalência de infecção pelo HPV em mulheres jovens é que dentre as mulheres jovens infectadas, somente 1% apresentam risco aumentado para desenvolver câncer cervical, sendo elas as portadoras dos tipos virais de alto risco oncogênico (Arends *et al.*, 1998; Nicolau, 2002; Richardson *et al.*, 2003; Wolschick *et al.*, 2007; Dehn *et al.*, 2007; Lipsy, 2008).

## 1.5 FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO PELO HPV E PARA O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES

Entre os fatores de risco para a infecção pelo HPV, a faixa etária, a idade do início da atividade sexual e o número de parceiros sexuais durante a vida figuram como os mais expressivos (Herrero *et al.*, 1989; Kahn *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008). Quanto ao tabagismo, ao uso de contraceptivos hormonais orais e as alterações na imunidade celular, os resultados ainda são inconclusivos (Koutsky, 1997; Baseman & Koutsky, 2005; Campos *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009).

Uma infecção pelo HPV é dependente de atividade sexual recente, entretanto, as infecções persistentes ou latentes podem ser consequência do comportamento sexual no passado. Um maior número de parceiros sexuais ao longo da vida aumenta o risco de infecção com um ou mais tipos de HPV (Lenselink *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram índices mais elevados de infecções e de anormalidades citológicas entre adolescentes, comparadas às mulheres adultas

(Murta *et al.*, 2001; Longatto Filho *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2005; Nascimento & Varga, 2008). Na adolescência, a replicação celular, a composição química do muco cervical (Derchain *et al.*, 1991), as alterações hormonais e comportamentais parecem facilitar a infecção pelo HPV (Murta *et al.*, 2001).

A idade no início da atividade sexual, assim como o número de parceiros sexuais estão ligados à aquisição da infecção pelo HPV, todavia não são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de lesões (Rousseau *et al.*, 2003). Com relação ao início da atividade sexual, demonstrou-se, que o risco para o desenvolvimento do câncer cervical é duas vezes maior nas mulheres que iniciam a atividade sexual antes dos 16 anos, comparadas com aquelas que iniciam depois dos 20 anos de idade (Muñoz *et al.*, 2002; Burd, 2003; Dunne *et al.*, 2007).

Estudos relacionando o uso de contraceptivos orais com o risco de câncer cervical são complexos e vem sendo inconsistentemente associados à infecção pelo HPV (Ley *et al.*, 1991; Noronha *et al.*, 2005). A liberdade e a independência feminina adquirida ao longo dos anos e fomentada pelo uso de anticoncepcionais orais possibilitam o início da atividade sexual em idade cada vez mais precoce, permitindo maior número de parceiros, contribuindo para o aumento das DST e para a neoplasia intra-epitelial de colo do útero (Murta *et al.*, 1999). Este aumento de risco seria explicado por ações hormonais que levariam à imunomodulação (Ley *et al.*, 1991), com maior susceptibilidade à infecção pelo HPV (Murta *et al.*, 2001; Queiroz *et al.*, 2007). O uso de anticoncepcionais orais poderia influenciar a progressão da infecção por favorecer a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro e estimular a transcrição dos genes E6 e E7 envolvidos na carcinogênese (Castellsague & Muñoz, 2003; Rosa *et al.*, 2009). Alguns estudos observaram, em mulheres com infecção pelo HPV, uma associação entre o uso de anticoncepcionais orais por mais de cinco anos e o carcinoma de colo uterino (Castellsague *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2009).

O tabagismo estaria relacionado à maior persistência e desenvolvimento das lesões pré-malignas e malignas induzidas pelo HPV (Murta *et al.*, 2001; Sellors *et al.*, 2003; Castellsague & Muñoz, 2003; Baseman & Koutsky, 2005). O tabagismo diminui significativamente a quantidade e a função das células de Langherans, células apresentadoras de antígenos, que são responsáveis pela ativação de imunidade celular local contra o HPV (Poppe *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2002; Giuliano *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2007).

Fatores que levam à supressão da imunidade celular, como o uso de drogas citotóxicas em transplantados, as imunodeficiências inatas ou adquiridas, como a AIDS, aumentam a persistência da infecção viral no indivíduo (Pinto *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2007). Mulheres imunodeprimidas apresentam risco elevado para o desenvolvimento de neoplasia escamosa intra-epitelial e invasiva do trato genital inferior (Pinto *et al.*, 2002).

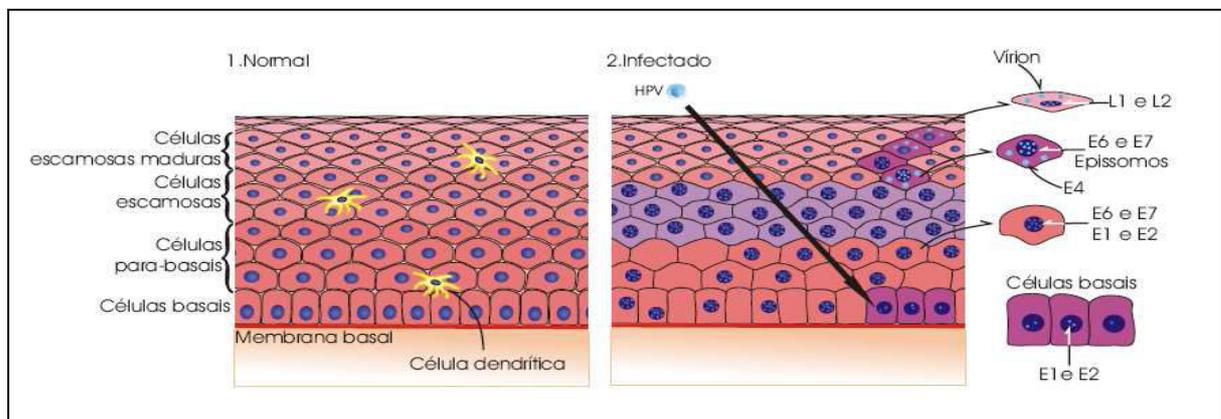
## 1.6 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HPV

A infecção inicia-se com a entrada do vírus em locais de micro traumatismos ou soluções de continuidade nos epitélios pavimentosos da pele ou mucosas do hospedeiro, freqüentemente durante a relação sexual com parceiro infectado. Após a inoculação, o vírus alcança a camada basal, onde o genoma é transportado ao núcleo das células, estabelecendo-se na forma episomal (Pereyra, 2000). À medida que estas células mais profundas do epitélio vão se dividindo, migram para as camadas superficiais, gradativamente mais diferenciadas (Stubenrauch & Laimins, 1999; Silva *et al.*, 2003; Souto *et al.*, 2005; Garnett & Duerksen-Hughes, 2006; Aggarwal *et al.*, 2006; Rogazy, 2007). Nestas células, na dependência de fatores do vírus e do hospedeiro, a infecção pode tornar-se produtiva, com formação de partículas virais completas, infectantes (Zur Hausen, 2002). A infecção produtiva pode evoluir para as formas subclínica e/ou clínica, representadas pelas lesões citológicas de baixo grau e pelos condilomas acuminados. Por outro lado, na infecção persistente por tipos oncogênicos pode ocorrer a integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro, que pode levar ao desenvolvimento de alterações genéticas com progressão para câncer invasor (Arends *et al.*, 1998; Zeferino *et al.*, 2002; Sellors *et al.*, 2003; Bagarelli & Oliani, 2004; Rama *et al.*, 2006; Bettini *et al.*, 2008).

A infecção pelo HPV pode evoluir para resolução espontânea, por atuação do sistema imune, principalmente em jovens (Sheary & Dayan, 2005), em um período de 8 a 24 meses após o seu início (INCA, 2010). Os tipos de alto risco persistem, em média, mais do que os de baixo risco (Sheary & Dayan, 2005). Todavia, pouco se sabe sobre a duração média de infecções por tipos específicos do HPV, bem como de suas variantes e do seu padrão de persistência (Fu Xi *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2003).

Duas classes de proteínas são codificadas pelo genoma do HPV: as proteínas transformadoras, que induzem funções na célula hospedeira e as proteínas reguladoras, que controlam a expressão dos genes virais (Queiroz *et al.*, 2007). Nas camadas mais superficiais da epiderme são expressas as proteínas L1 e L2, que constituem o capsídio e posterior montagem das partículas virais. As alterações induzidas pelo HPV são causadas pela combinação de genes virais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os primeiros genes a se expressarem são os genes E1 e E2 cujos produtos estão envolvidos na replicação e transcrição do genoma viral (Rogazy, 2007). O produto do gene E1 é essencial para a replicação viral. A proteína codificada pelo gene E2 é um fator que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7 (Arends *et al.*, 1998; Burd, 2003; Souto *et al.*, 2005). O gene E2 é freqüentemente o local de quebra do genoma circular para sua integração no genoma da célula hospedeira. Uma vez que a proteína E2 reprime a expressão dos genes E6 e E7, a ruptura do genoma viral na região do gene E2 é acompanhada de aumento concomitante dos níveis de expressão destas oncoproteínas (Burd, 2003; Mandic & Vujkov, 2004; Garnett & Duerksen-Hughes, 2006). As etapas do ciclo de infecção e replicação do HPV estão representadas na figura 4.

A proteína E6 associa-se à proteína p53, que resulta na ubiquitinação de p53 seguido por sua rápida degradação (Souto *et al.*, 2005; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008; Beaudenon & Huibregtse, 2008). A proteína E7 dos HPV liga-se às proteínas da família pRb, e esta interação permite que a proteína E2F atue na ativação constitutiva dos fatores transcricionais da célula hospedeira, o que acarreta a progressão do ciclo celular (Souto *et al.*, 2005).

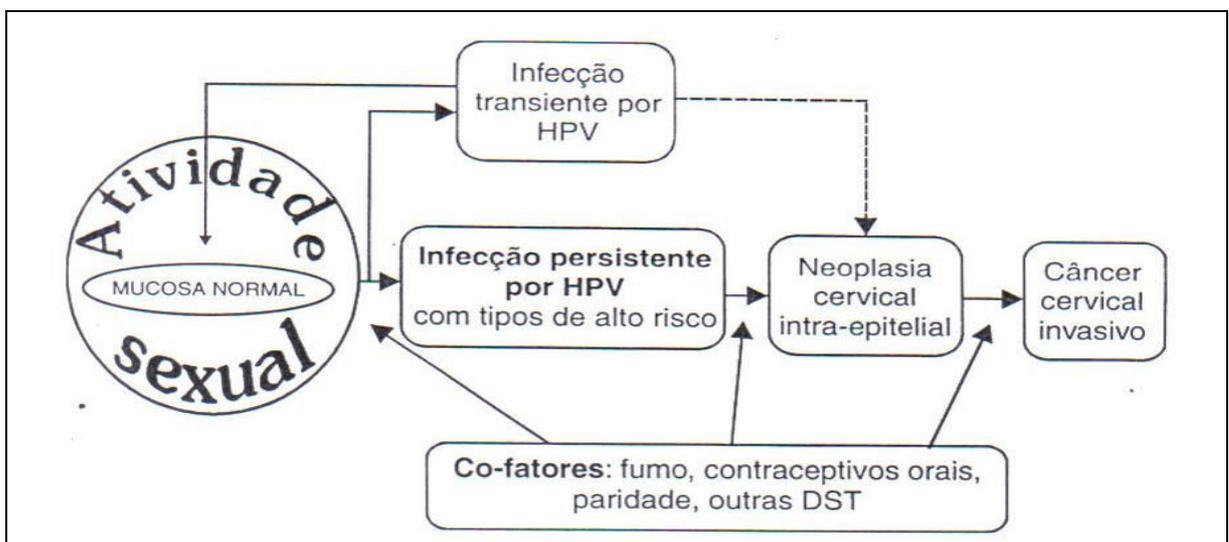


**FIGURA 4:** Etapas do ciclo de infecção e replicação do HPV  
 FONTE: Modificado de Muñoz *et al.*, 2006.

Ambos os eventos, a promoção da degradação de p53 por E6 e o bloqueio da função do gene RB por E7, impedem a regulação normal do crescimento celular, particularmente de células com DNA danificado (Wolf *et al.*, 2003; Palefsky, 2006). A eficiência do processo de transformação aumenta quando as duas proteínas virais (E6 e E7) são expressas conjuntamente (Garnett & Duerksen-Hughes, 2006; Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008). E6 e E7 são os dois únicos genes virais expressos em praticamente todos os carcinomas cervicais HPV positivos (Beaudenon & Huibregtse, 2008).

Os HPV de baixo e alto risco diferem em sua capacidade de induzir imortalização e transformação celular, bem como de interagir com os vários componentes do ciclo celular, o que resulta na perda dos pontos de checagem do ciclo celular, importantes para a manutenção do genoma do hospedeiro e para a prevenção do acúmulo de anormalidades genéticas (Brenna & Syrjanen, 2003).

O exame citológico de Papanicolaou avalia o grau de alterações celulares presentes no epitélio descamativo cervical. Atualmente, o sistema de classificação citológica de Bethesda é o mais utilizado, classificando as anormalidades epiteliais cervicais em células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), células escamosas atípicas não excluindo lesão intraepitelial escamosa de alto grau (ASC-H), lesões intraepitelial escamosa de baixo (LSIL) e de alto grau (HSIL) e células glandulares atípicas (AGC) (Solomon *et al.*, 2002), conforme demonstrado no quadro 2 a seguir.



**FIGURA 5:** Fatores de risco envolvidos na história natural das infecções pelo HPV e neoplasia do colo uterino

FONTE: Modificado de Villa, 1995.

Negativo para lesão intra-epitelial ou neoplasia maligna
Anomalias de células epiteliais
Célula escamosa
Células escamosas atípicas (ASC)
"de significado indeterminado" (ASCUS)
"não pode excluir HSIL" (ASC-H)
Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL)
Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL)
Carcinoma escamoso
Glandular
Células glandulares atípicas (AGC)
( <i>endocervicais, endometriais ou não-especificadas</i> )
Células glandulares atípicas, provavelmente neoplásicas
( <i>endocervicais ou não especificadas</i> )
Adenocarcinoma <i>in situ</i> endocervical (AIS)
Adenocarcinoma
Outro (lista não integral)
Células endometriais em mulher acima de 40 anos de idade

**QUADRO 2:** Classificação das lesões cervicais de acordo com o sistema de Bethesda de 2001  
 FONTE: Solomon *et al.*, 2002.

Os genótipos de alto risco oncogênico, especialmente o HPV 16, são comumente detectados em mulheres que desenvolvem infecções persistentes e com múltiplos tipos. As infecções com múltiplos tipos de HPV desempenham um papel importante no desenvolvimento e/ou progressão das lesões cervicais, comparadas às infecções com um único tipo (Trottier *et al.*, 2006). Lesões causadas pelo HPV 16 apresentam risco cinco vezes maior para progredir, em comparação com lesões causadas por outros tipos oncogênicos de HPV (Sellors *et al.*, 2003; Bagarelli & Oliani, 2004).

Um estudo prospectivo envolvendo mulheres brasileiras mostrou que aquelas com infecção persistente pelos HPV 16 e 18 apresentam maior risco de desenvolver lesões intraepiteliais escamosas (Schlecht *et al.*, 2001). Em consonância com este achado, mulheres com infecção cervical pelo HPV têm um risco maior (78%) de ter NIC 2/3 (Johnson, 1995). Mulheres com citologia cervical normal, infectadas pelo HPV, apresentaram, aproximadamente, risco 100 vezes

maior de desenvolver NIC 3 quando comparadas com mulheres não infectadas pelo HPV (Aggarwal *et al.*, 2006).

A resolução de uma infecção causada por um tipo específico de HPV induz imunidade parcial ou total para este tipo viral (Schiffman, 2007). Porém, estudos demonstraram que a ausência de células de memória para a infecção por um tipo específico de HPV permite infecções repetidas com o mesmo tipo (Richardson *et al.*, 2003; Lipsy, 2008). Já para as lesões induzidas pelo HPV, as evidências mostram que a NIC 1 regride espontaneamente em 57% dos casos. Nos casos de NIC 2, a regressão ocorreria em 43% dos casos e, de NIC 3, em 32%. As evidências mostraram ainda que as NIC 2 e NIC 3 evoluem para câncer invasor em aproximadamente 5% e 12% dos casos, respectivamente (Östor, 1993).

## 1.7 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV

As técnicas de biologia molecular permitem a detecção do DNA do HPV, mesmo na ausência de alterações morfológicas (Wolschick *et al.*, 2007). Os métodos de detecção do genoma do HPV incluem as hibridizações moleculares de ácidos nucléicos, tipo *Southern Blot*, Captura Híbrida, Hibridização *in situ* e Reação em Cadeia de Polimerase (Hubbard, 2003; Oliveira *et al.*, 2003; Salvia, 2004; Molijn *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2007). Estes testes diferem em sensibilidade, especificidade, aplicação prática e custo (Wolschick *et al.*, 2007).

A hibridização *in situ* (HIS) detecta seqüências específicas de DNA ou RNA, sendo possível detectar até uma única cópia viral por célula e permitindo a avaliação do estado físico (epissomal ou integrado ao genoma do hospedeiro) do HPV. A HIS também possibilita estabelecer a correlação com os aspectos histopatológicos (Bagarelli & Oliani, 2004). A HIS é uma técnica bastante específica, porém pouco sensível o que é explicado por necessitar de DNA íntegro em grande quantidade no tecido (Salvia, 2004).

A hibridização por *Southern Blot* é utilizada para a detecção do DNA do HPV a partir do DNA de espécimes celulares, já foi considerada como o “padrão-ouro” para detecção do HPV, devido o seu elevado grau de especificidade e sensibilidade (Wolschick *et al.*, 2007). É um procedimento de excelente qualidade, mas requer grande quantidade de DNA purificado de alta qualidade (Hubbard, 2003; Oliveira *et al.*, 2003), amostras frescas e é extremamente trabalhoso e dispendioso,

sendo utilizado ocasionalmente em experimentos de pesquisa, mas não para indicações clínicas (Wolschick *et al.*, 2007).

A Captura Híbrida (CH) é uma reação de hibridização molecular, com amplificação do sinal dos híbridos formados pela utilização de sonda de RNA específico, não radioativa. Estes híbridos de DNA-RNA são posteriormente capturados por anticorpos monoclonais e visualizados através de métodos de quimioluminescência (Hubbard, 2003; Souza, 2004; Salvia, 2004; Cavalcanti & Carestiato, 2006). A CH é um procedimento de processamento rápido e leitura confiável para detectar 18 tipos de HPV divididos em grupos de baixo e de alto risco oncogênico (Hubbard, 2003; Gontijo *et al.*, 2005), além de permitir avaliação de carga viral (Salvia, 2004; Rama, 2006). O método não distingue entre os tipos de HPV dentro destes grupos (Hubbard, 2003; Molijn *et al.*, 2005; Wolschick *et al.*, 2007).

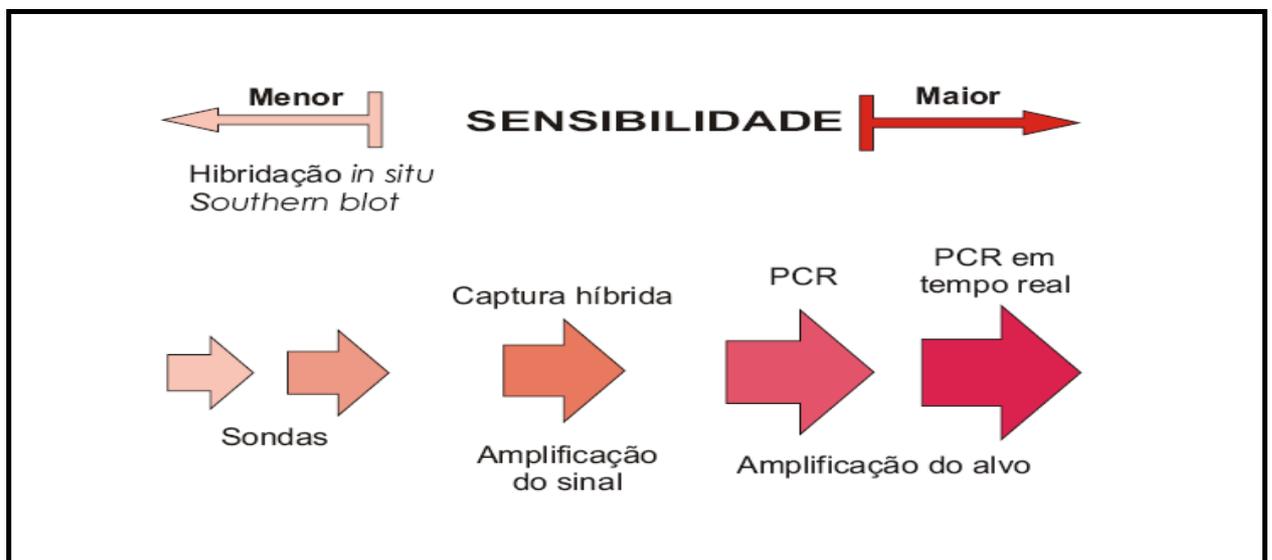
A segunda geração desta técnica, a versão Captura Híbrida II (CHII) idealizada para a detecção de 13 tipos de alto risco, é um método de fácil realização, rápido e reprodutível, aplicado à análise de um grande número de amostras (Wolschick *et al.*, 2007). Apresenta alguns problemas de resultados falso-positivos, resultantes de reações cruzadas e de falso-negativos (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

A PCR é uma técnica que permite a multiplicação *in vitro* de regiões específicas do DNA e pode ser usada para detecção, genotipagem, quantificação da carga viral e sequenciamento (Hubbard, 2003; Molijn *et al.*, 2005). É a ferramenta mais sensível para a detecção e genotipagem do HPV, em células coletadas do colo uterino (Nicolau, 2002; Souza, 2004; Novaes *et al.*, 2006; Wolschick *et al.*, 2007). Na PCR são utilizados iniciadores gerais (consensuais) ou iniciadores tipo específicos para a amplificação do DNA do HPV. Com o uso de iniciadores tipo específicos consegue-se detectar apenas um tipo do HPV em cada reação. Isto limita a utilidade clínica da PCR, já que diversos tipos do HPV podem ser encontrados nas infecções genitais. Por outro lado, com os iniciadores gerais, pode-se amplificar vários tipos do HPV em uma única reação (Van Doorn *et al.*, 2001).

Os protocolos mais utilizados atualmente fazem uso de oligonucleotídeos iniciadores consensuais, MY09/11, PGMY09/11, GP5+/GP6+ e SPF, que amplificam uma região dentro do gene L1, comum a vários tipos de HPV. Sistemas de PCR usando múltiplos oligonucleotídeos iniciadores como o PGMY09/11, por exemplo, tem-se mostrado mais eficientes na detecção de infecções múltiplas do que sistemas que utilizam oligonucleotídeos iniciadores consensuais simples (Iftner & Villa, 2003; Lima, 2009).

Regiões amplificadas do genoma do HPV, geradas com os oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11, podem ser genotipadas pelo ensaio *line blot* (LB), a reação de hibridização reversa não-isotópica (Kornegay *et al.*, 2003).

A sensibilidade de um método diagnóstico pode ser definida como o limite de detecção ou como a menor quantidade de DNA disponível necessária para ser detectada. A especificidade determina o nível de precisão de um método. Para que uma metodologia seja precisa e confiável, o ideal é que, por ela, se obtenha o mínimo possível de resultados falso-negativos e falso-positivos (Hubbard, 2003).



**FIGURA 6:** Testes moleculares e grau de sensibilidade  
 FONTE: Modificado de Hubbard, 2003.

O índice de especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem do tipo de *primer*, da técnica de referência a ser utilizada, do tipo de material, do método de detecção do produto amplificado, do método de preparação da amostra para o PCR, considerando a presença de inibidores e ocorrência de contaminação do tamanho de produto da PCR. Depende ainda do desempenho da DNA polimerase utilizada na reação e da quantidade de DNA do HPV amplificado (Iftner & Villa, 2003; Igansi, 2005; Carmo & Fiorini, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVAS

O presente estudo se justifica pelas seguintes observações:

(1) A prevalência da infecção pelo HPV varia em diferentes países e, dentro do mesmo país, nas diferentes regiões. Desse modo, a epidemiologia da infecção deve ser avaliada em cada região geográfica.

(2) Poucos estudos avaliaram a prevalência da infecção pelo HPV em jovens universitárias, mais especificamente no Estado de Goiás, onde não há publicação referente a este tema.

(3) A disponibilidade atual de técnicas de biologia molecular com acurácia elevada para detecção do genoma do HPV permite avanços no estudo da epidemiologia da infecção, por possibilitar a detecção da infecção com elevada sensibilidade e especificidade.

(4) O estabelecimento de estratégias adequadas para a prevenção do câncer cervical requer o conhecimento prévio da epidemiologia da infecção pelo HPV, em diferentes faixas de idade e nível socioeconômico e cultural.

### **3 OBJETIVOS**

(1) Estimar a prevalência da infecção pelo HPV em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade, na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás.

(2) Avaliar os fatores de risco para a infecção pelo HPV em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade, na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás.

(3) Avaliar os possíveis fatores associados as anormalidades citológicas em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade, na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 DESENHO DO ESTUDO**

O trabalho consistiu de um estudo de corte transversal. Amostras cervicais obtidas de adultas jovens foram coletadas e submetidas à análise para a detecção de anormalidades citológicas e para a detecção molecular do genoma do HPV.

### **4.2 ENCAMINHAMENTO E APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás – CEP/ACCG sob nº 014/08, em 12/02/2008 (Anexo I).

### **4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES**

O estudo incluiu 107 amostras cérvico-vaginais obtidas de adultas jovens, universitárias, com idades entre 18 e 25 anos, da Faculdade Montes Belos, em São Luís de Montes Belos, em Goiás. Todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos do estudo, o método de coleta, os possíveis riscos e o destino do material coletado. Após serem informadas e concordarem em participar do estudo, as pacientes incluídas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1). As mulheres que atenderam ao convite foram encaminhadas para uma entrevista individual com a pesquisadora, na qual responderam um questionário (Apêndice 2), contendo dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica. Posteriormente, essas pacientes foram submetidas ao exame ginecológico com coleta de material cérvico-vaginal pelo ginecologista colaborador do estudo, para exame citológico e detecção do genoma viral.

### **4.4 COLETA DE ESPÉCIMES CERVICO-VAGINAIS**

As amostras cérvico-vaginais foram coletadas no ambulatório de enfermagem da Faculdade Montes Belos, em São Luís de Montes Belos. As

participantes foram submetidas a exame clínico cuidadoso, com inspeção da genitália externa e interna, e região perianal. A seguir, com uma espátula de *Ayre*, foi coletado material da ectocérvice e com uma escova de *cytobrush*, com um diâmetro 5 a 8 mm, foi coletado material da endocérvice (com movimentos rotatórios). As lâminas contendo os esfregaços foram imediatamente fixadas e encaminhadas para exame citológico. O material colhido com a *cytobrush* foi colocado em uma solução-tampão preservadora (*Universal Colection Médium – Digene Corporation*) e utilizado para pesquisa do DNA do HPV, utilizando o método de PCR. As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA, no Laboratório de Diversidade Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

#### 4.4.1 Critérios de inclusão

- mulheres com idades entre 18 e 25 anos;
- assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela participante;
- concordância em responder ao questionário do estudo relacionado aos seus dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica;
- submissão à coleta de material cérvico-vaginal.

#### 4.4.2 Critérios de exclusão

- mulheres que não atenderam a pelo menos um dos critérios de inclusão acima descritos;
- grávidas, virgens, histerectomizadas e durante o período menstrual.

### 4.5 EXAME CITOLÓGICO DO MATERIAL CÉRVICO-VAGINAL

O estudo dos esfregaços citológicos foi realizado pela equipe de citologistas do Laboratório Rômulo Rocha, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, sob a supervisão da Dra. Silvia Helena Rabelo, colaboradora deste estudo. Utilizou-se a técnica de Papanicolaou para coloração

das lâminas e leitura sob microscópio óptico. As anormalidades citológicas foram classificadas de acordo com o sistema de Bethesda em atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US), atipias de células escamosas que não afasta lesão de alto grau (ASC-H), lesões de baixo (LSIL) e de alto grau (HSIL) e atipias de células glandulares (AGC) (Solomon *et al.*, 2002).

#### 4.6 DETECÇÃO MOLECULAR DO GENOMA DO HPV NOS ESPÉCIMES ENDORCERVICAIS UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR

O material preservado em solução-tampão preservadora (*Universal Collection Medium* – DIGENE) foi processado para extração de DNA. A extração do DNA do HPV das amostras coletadas foi feita com a utilização do kit comercial **PURE LINK INVITROGEN**, utilizando o protocolo do fabricante (Apêndice 3).

4.6.1 Análise da qualidade do DNA extraído por meio de amplificação de um segmento do gene GAPDH:

A fim de verificar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores da PCR, um fragmento do DNA genômico com cerca de 98pb, contendo parte do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), considerado um gene constitutivo humano, foi amplificado para cada amostra de DNA extraído. As reações de PCR mediadas por oligonucleotídeos iniciadores específicos para GAPDH foram realizadas num volume final de 25µl, utilizando um termociclador e os reagentes descritos no quadro 3. As condições de ciclagem usadas encontram-se descritas no quadro 4 (os itens em destaque foram repetidos por 40 ciclos).

Protocolo de PCR para amplificação do gene constitutivo de GAPDH			
Reagente	[ ] inicial	[ ] final	Volume para uma reação
Tampão 10x	[ 10x ]	[ 1x ]	2,5 ul
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1,0 ul
dNTP's	2 mM	0,2 mM	2,5 ul
P <sup>1</sup>	2,5 uM	0,05 uM	0,5 ul
P <sup>2</sup>	2,5 uM	0,05 uM	0,5 ul
DNA	100 ng/ul	2 ng/ul	2,0 ul
Taq. Pol.	5 U/ul	0,2 U/ul	1,0 ul
H <sub>2</sub> O milli-Q	q.s.p. 25ul		15,0 ul
<b>Total</b>	-----	-----	<b>25, 0 ul</b>

QUADRO 3: Protocolo de PCR para amplificação do gene constitutivo de GAPDH

<b>Protocolo de ciclagem</b>	
<b>94 C</b>	5 minutos
<b>94 C</b>	30 segundos
<b>59 C</b>	1 minuto (35 ciclos)
<b>72 C</b>	1 minuto
<b>72 C</b>	7 minutos
<b>4 C</b>	<b>Infinito</b>

**QUADRO 4:** Protocolo de ciclagem.

Para não haver contaminação da PCR, esta foi realizada em câmara de fluxo laminar previamente limpa com hipoclorito de sódio a 10%, depois com álcool 70% e irradiada com luz ultra-violeta por 15 minutos. Todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, de forma a preservar o DNA, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Os tubos de PCR foram marcados de acordo com a lista da amostra. Os reagentes foram pipetados na seguinte ordem: H<sub>2</sub>O mili-Q, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's, P<sup>1</sup>, P<sup>2</sup> e Taq. Pol. Após a pipetagem dos reagentes, os tubos foram homogeneizados e centrifugados rapidamente (*spin down*). Em seguida adicionou-se, a cada tubo marcado de PCR, 23 ul de MIX e 2 ul de DNA. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. Como controle positivo utilizou-se DNA humano extraído do sangue. O protocolo para PCR de GAPDH com todos os reagentes encontra-se descrito no quadro 3. As amplificações foram realizadas em termociclador e as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições da PCR estão descritas no quadro 5.

Após o término da reação, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata (Apêndice 4), para verificação de uma banda de aproximadamente 98pb correspondente ao fragmento do gene GAPDH. As amostras positivas para a amplificação de GAPDH foram submetidas a reações de PCR para a detecção do DNA do HPV. As amostras negativas para o gene GAPDH tiveram o DNA re-extraído e foram novamente testadas para esse gene. Somente as amostras positivas para o GAPDH foram utilizadas para detecção.

4.6.2 Detecção do genoma viral utilizando os oligonucleotídeos iniciadores consensuais PGMY09/11:

Para detecção do genoma do HPV, foi utilizada a técnica convencional de PCR com oligonucleotídeos iniciadores consensuais PGMY09/11, cujo produto é

visualizado pela presença de uma banda de aproximadamente 450 pb. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores PGMY09/11 encontram-se no quadro 5. As concentrações dos reagentes utilizados nesta reação encontram-se descritos no quadro 3, e o protocolo de ciclagem encontra-se descrito no quadro 4. Cada experimento de amplificação utilizou controles positivos e negativos para garantir a confiabilidade da reação.

Nome do primer	Seqüência do primer (5'-3')
PGMY11-A .....	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B .....	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C .....	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D .....	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGYM11-E .....	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F.....	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G .....	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H.....	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I .....	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J .....	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K .....	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L .....	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M .....	CGA CCT GAT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N .....	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P.....	G CC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q.....	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R .....	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01.....	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

**QUADRO 5:** Seqüência do *primer* PGMY09/11

#### 4.6.3 Processamento e análise de dados:

O banco de dados foi construído no programa EPIDATA. As informações foram digitadas a partir do questionário, contendo os dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica assim como os resultados dos exames citológicos e moleculares. Para análise de dados foi utilizado o programa de análise

estatística Epi Info versão 3.5.1, de 13 de agosto de 2008. Os dados sócio-demográficos, comportamentais, história sexual e obstétrica foram analisados por estatística descritiva. Foi realizada análise univariada com cálculo do Odds Ratio (OR), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e nível de significância estatística de 5%.

## 5 RESULTADOS

As características sócio-demográficas, de comportamento sexual e os antecedentes de gravidez na amostra estudada são apresentadas na tabela 2. A média da idade das 107 estudantes universitárias foi de 21,7 com desvio padrão de 2,6 anos, 59 (55,1%) eram solteiras, 61 (57,0%) tinham renda familiar inferior a dois salários mínimos e 3 (2,8%) eram fumantes. Vinte e seis (24,3%) tiveram a primeira relação sexual até os 15 anos, 23 (21,5%) com mais de três parceiros e 92 (86,0%) referiram um único parceiro nos últimos seis meses. Apenas 24 (22,4%) relataram uso freqüente do preservativo pelo parceiro e 39 (36,4%) referiram antecedente de gravidez.

**TABELA 2:** Características sócio-demográficas, de comportamento sexual e antecedente de gravidez das 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás.

Variáveis	n	%
<b>Idade (anos)</b>		
18	15	14,0
19	12	11,2
20	16	15,0
21	10	9,3
22	5	4,7
23	6	5,6
24	16	15,0
25	27	25,2
<b>Estado civil</b>		
Sem união estável	59	55,1
Casada/União estável	41	38,3
Sem informação	7	6,5
<b>Renda familiar (salário mínimo)</b>		
Abaixo de 2	61	57,0
2 a 4	30	28,0
Acima de 4	11	10,3
Sem informação	5	4,7
<b>Tabagismo</b>		
Sim	3	2,8
Não	101	94,4
Sem informação	3	2,8
<b>Idade na primeira relação sexual (anos)</b>		
Até 15	26	24,3
Acima de 15	81	75,7
<b>Número de parceiros sexuais</b>		
Até 3	84	78,5
mais de 3	23	21,5
<b>Número de parceiro nos últimos seis meses</b>		
Até 1	92	86,0
Mais de 1	15	14,0

Cont.

Variáveis	n	%
<b>Uso do preservativo pelo parceiro</b>		
Frequentemente	24	22,4
Ocasionalmente/raramente	80	74,8
Sem informação	3	2,8
<b>Uso de método contraceptivo hormonal</b>		
Sim	66	61,7
Não	38	35,5
Sem informação	3	2,8
<b>Antecedente de gravidez</b>		
Não	68	63,6
Sim	39	36,4

A prevalência da infecção pelo HPV nas 107 estudantes universitárias foi de 39,3% (IC95%: 30,0-49,2). A tabela 3 mostra a análise univariada dos potenciais fatores associados à infecção pelo HPV nas 107 estudantes universitárias. Das variáveis estudadas, o início da atividade sexual até os 15 anos de idade e o número de parceiros sexuais acima de três foram significativamente associados à infecção, com OR 2,7 (IC95% 1,1-6,7) e 2,4 (IC95%: 0,9-6,3), respectivamente.

**TABELA 3:** Análise univariada dos potenciais fatores associados à infecção pelo HPV em 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás.

Variáveis	Infecção pelo HPV		OR (IC 95%)	p
	n/total	%		
<b>Idade (anos)</b>				
Até 22	24/58	41,4	1,2 (0,5-2,6)	0,31
Acima de 22	18/49	36,7		
<b>Estado civil<sup>a</sup></b>				
Sem união estável	24/59	40,7	1,3 (0,5-3,0)	0,25
Casada/União estável	14/41	34,1		
<b>Renda familiar (salário mínimo)<sup>b</sup></b>				
Até 2	24/61	39,3	0,8 (0,3-1,8)	0,32
Acima de 2	18/41	43,1		
<b>Tabagismo<sup>c</sup></b>				
Sim	3/3	100,0	0,00 (ND-ND)	-
Não	39/101	38,6		
<b>Idade na primeira relação sexual (anos)</b>				
Até 15	15/26	57,7	2,7 (1,1-6,7)	0,01
Acima de 15	27/81	33,3		
<b>Número de parceiros sexuais</b>				
Mais de 3	13/23	56,5	2,4 (0,9-6,3)	0,03
Até 3	29/84	34,5		

Cont.

Variáveis	Infecção pelo HPV		OR (IC 95%)	p
	n/total	%		
<b>Número de parceiro nos últimos seis meses</b>				
Mais de 1	6/15	40,0	1,0 (0,3-3,1)	0,47
Até 1	36/92	39,1		
<b>Uso do preservativo pelo parceiro<sup>a</sup></b>				
Ocasionalmente/raramente	31/80	38,8	0,7 (0,2-1,8)	0,27
Frequentemente	11/24	45,8		
<b>Uso de método contraceptivo hormonal<sup>e</sup></b>				
Hormonal	22/66	33,3	0,5 (0,2-1,25)	0,08
Outro/nenhum	18/38	47,4		
<b>Antecedente de gravidez</b>				
Sim	13/39	33,3	0,6 (0,2-1,5)	0,17
Não	29/68	69,0		

<sup>a</sup> 7 participantes sem informação; <sup>b</sup> 5 participantes sem informação; <sup>c</sup> 3 participantes sem informação;

<sup>d</sup> 3 participantes sem informação; <sup>e</sup> 3 participantes sem informação

Dos 107 esfregaços citológicos coletados, quatro foram considerados insatisfatórios para avaliação e 99 (96,1) normais. A prevalência de anormalidades citológicas, segundo a Classificação Citológica de Bethesda (Solomon *et al.*, 2002) foi de 3,7% (IC95%: 1,0-9,3), das quais duas foram categorizadas como ASC-H e duas como lesão de baixo grau. Não foram observadas, na amostra estudada, lesões de alto grau, atipias de células glandulares e achados citológicos sugestivos de câncer cervical invasor.

A tabela 4 mostra que, pela análise univariada, nenhum dos fatores avaliados foi significativamente associado às anormalidades citológicas nas 107 estudantes universitárias.

**TABELA 4:** Análise univariada dos potenciais fatores associados às anormalidades citológicas em 107 estudantes universitárias da região de São Luís de Montes Belos, Goiás.

Variáveis	Anormalidade citológica		OR (IC 95%)	p
	n/total	%		
<b>Idade (anos)</b>				
Até 22	3/56	5,4	2,6 (0,2-25,9)	0,37
Acima de 22	1/47	2,1		
<b>Estado civil<sup>a</sup></b>				
Sem união estável	2/56	3,6	1,5 (0,1-16,9)	0,61
Casada/União estável	1/41	2,4		

Cont.

Variáveis	Anormalidade citológica		OR (IC 95%)	p
<b>Renda familiar (salário mínimo)<sup>b</sup></b>				
Até 2	3/88	3,4	0,3 (0,0-3,4)	0,35
Acima de 2	1/10	10,0		
<b>Tabagismo<sup>c</sup></b>				
Sim	0/3	0,0	0,0 (ND-ND)	-
Não	4/97	4,1		
<b>Idade na primeira relação sexual (anos)</b>				
Até 15	1/25	4,0	1,0 (0,1-10,8)	0,67
Acima de 15	3/78	3,8		
<b>Número de parceiros sexuais</b>				
Mais de 3	0/21	0,0	0,0 (ND-ND)	-
Até 3	4/82	4,9		
<b>Número de parceiro nos últimos seis meses</b>				
Mais de 1	0/14	0,0	0,0 (ND-ND)	-
Até 1	4/89	4,5		
<b>Uso do preservativo pelo parceiro</b>				
Nunca/ocasionalmente	3/80	3,8	0,8 (0,1-8,6)	0,42
Sempre	1/23	4,3		
<b>Uso de método contraceptivo hormonal</b>				
Hormonal	3/62	4,8	2,0 (0,2-20,2)	0,30
Outro/nenhum	1/41	2,4		
<b>Antecedente de gravidez</b>				
Sim	1/38	2,6	0,5 (0,0-5,5)	0,34
Não	3/65	4,6		
<b>PCR para HPV</b>				
Positiva	0/38	0,0	0,0 (ND-ND)	-
Negativa	4/65	6,2		

<sup>a</sup> 6 participantes sem informação; <sup>b</sup> 5 participantes sem informação; <sup>c</sup> 3 participantes sem informação

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram uma elevada prevalência da infecção pelo HPV, 39,3% (42/107) (IC95%: 30,0-49,2), em adultas jovens universitárias. Este resultado é compatível com estudos que avaliaram a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres jovens variando de 8,6 a 57,1% (Rama *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Lenselink *et al.*, 2008; Datta *et al.*, 2008; Dursun *et al.*, 2009; Stamataki *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010), sendo a maior prevalência (57,1%) observada em mulheres gregas com idades entre 16 e 20 anos (Stamataki *et al.*, 2010) (tabela 1). Da mesma forma, alguns estudos também conduzidos em jovens universitárias apresentaram resultados variando entre 15,2 e 52,65% (Nonnenmacher *et al.*, 2002; Winer *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2008) (tabela 1). Em Washington, um estudo prospectivo em universitárias com idades entre 18 e 20 anos, sexualmente ativas, empregando a PCR, detectou uma incidência cumulativa, em 24 meses, da infecção pelo HPV de 38,8% (IC95%: 33,3- 45,0) (Winer *et al.*, 2003). As variações entre os estudos refletem, provavelmente, diferenças na população estudada com relação aos fatores de risco de exposição ao HPV e a sensibilidade do método diagnóstico utilizado para detecção da infecção pelo HPV (Castellsague *et al.*, 2002; Rama *et al.*, 2008; Dursun *et al.*, 2009).

O nível de escolaridade indica algum conhecimento em matéria de informação sexual. Estudo transversal com 975 mulheres atendidas em um serviço público de rastreamento para o câncer cervical, em Porto Alegre, Brasil, observou que as mulheres com mais anos de escolaridade estão positivamente associadas à infecção. Uma explicação para esse fato poderia ser que estas mulheres teriam maior acesso à informação e aos exames de prevenção para esta infecção (Nonnenmacher *et al.*, 2002). Embora o conhecimento seja um pré-requisito necessário para um comportamento sexual seguro ele não garante, por si só, uma adequada proteção (Andersson-Ellström & Milsom, 2002). Além disso, alguns estudos mostraram que a probabilidade de adquirir a infecção é elevada em mulheres jovens e em adolescentes, mesmo para aquelas com parceiro único (Woodman *et al.*, 2001; Winer *et al.*, 2003). A vulnerabilidade biológica do colo uterino, nestas faixas de idade configura-se como fator importante a explicar a

elevada prevalência da infecção (Moscicki *et al.*, 1998; Murta *et al.*, 2001; Kahn *et al.*, 2002).

No presente estudo, a análise revelou que não houve associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e as variáveis estudadas, como idade, estado civil, tabagismo, uso de preservativo pelo parceiro, uso de método contraceptivo hormonal e paridade. Outros estudos também não encontraram uma associação entre a infecção pelo HPV e estado civil, renda familiar, tabagismo, uso de preservativo pelo parceiro, uso de método contraceptivo ou paridade (Murta *et al.*, 2001; Sellors *et al.*, 2003; Fedrizzi *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; Stamataki *et al.*, 2010).

Vários estudos demonstraram que dentre os fatores de risco para a infecção pelo HPV, a idade jovem, o início precoce da atividade sexual e o número de parceiros figuram como os mais expressivos (Kahn *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2008; Lenselink *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008). No presente estudo, o início da atividade sexual até os 15 anos de idade (média 16,74; DP: 1,71) e o número de parceiros sexuais acima de três foram significativamente associados à infecção, com risco de 2,7 (IC95% 1,1-6,7) e 2,4 (IC95%: 0,9-6,3), respectivamente, em concordância com estudos anteriores (Manhart *et al.*, 2006; Lenselink *et al.*, 2008). Ho *et al.*, 2008, demonstraram que universitárias que tiveram  $\geq 4$  parceiros nos últimos seis meses apresentaram risco 3,6 maior de adquirir infecção pelo HPV. Por outro lado, diferente de outros (Woodman *et al.*, 2001; Winer *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2003; Sellors *et al.*, 2003), este estudo não demonstrou associação entre o número de parceiros recentes e a infecção pelo HPV. O estudo de Sellors demonstrou que o número de parceiros no último ano foi significativamente associado com a maior incidência da infecção pelo HPV, com risco de 6,2 (IC 95%: 1,6–24,5) (Sellors *et al.*, 2003).

Em relação aos preservativos, alguns estudos não encontraram evidências de que o seu uso poderia proteger contra a infecção pelo HPV (Richardson *et al.* 2000; Rousseau *et al.* 2003). Isso pode ser explicado pela transmissão do HPV ocorrer geralmente por meio do contato sexual ou por fragmentos de tecido infectado que penetram através de soluções de continuidade (Queiroz *et al.*, 2007). Os preservativos podem ajudar a reduzir o risco de aquisição de uma infecção pelo HPV. No entanto, como os preservativos não cobrem todas as

áreas da região genital, eles não são capazes de prevenir completamente a infecção (Lipsy, 2008).

O presente estudo não encontrou efeito protetor do uso de preservativos, que poderia ser decorrência do pequeno tamanho amostral, mas também pelo fato deste estudo não ter sido projetado para avaliar o papel do preservativo masculino. Todavia, estudos desenhados para avaliar o desempenho do preservativo na prevenção da infecção pelo HPV demonstraram que o uso correto e consistente do preservativo pode além de proteger contra a infecção, reduzir a persistência viral e conseqüentemente o desenvolvimento de anormalidades citológicas (Shew *et al.*, 2006; Steiner & Willard, 2006; Winer *et al.*, 2006).

A prevalência de anormalidades citológicas encontrada na amostra estudada foi de 3,7% (IC 95% 1,0-9,3). Segundo dados de literatura a prevalência de anormalidades citológicas varia de 12,5 a 17% em jovens (Souza, 2004; Oliveira *et al.*, 2010) e de 6,4 a 45,5% em adultas (Medeiros *et al.*, 2005; Trottier & Franco, 2006; Cavalcante, 2007; Rama *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2008; Dursun *et al.*, 2009). Levando em consideração o grau de anormalidades citológicas, a prevalência varia de 1,1 a 10,7% em ASCUS, de 2,0 a 6,0% em LSIL e 0,4 a 1,17% em HSIL (Souza, 2004; Medeiros *et al.*, 2005; Cavalcante, 2007; Wright *et al.*, 2007; Rama *et al.*, 2008).

Sabe-se que a infecção pelo HPV está freqüentemente associada aos resultados anormais de citologia (Pinto *et al.*, 2002). Mulheres infectadas pelo HPV apresentam risco significativamente maior de apresentar anormalidade citológica (Kjaer *et al.*, 2002). Em mulheres com anormalidade citológica a presença da infecção pelo HPV gira em torno de 36,0 a 59,8% dos casos (Cavalcante, 2007; Fernandes *et al.*, 2008; Dursun *et al.*, 2009), variando entre 13,8 a 28,9% nas ASCUS, 51,0 a 76,6% nas LSIL e em 50 a 100% nas HSIL ou câncer (Herrero *et al.*, 2000; Nonnenmacher *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005; Cavalcante, 2007; Wright *et al.*, 2007; Dursun *et al.*, 2009). No presente estudo não foi detectada a infecção pelo HPV em estudantes com anormalidades citológicas. O fato pode ser atribuído a variabilidade entre observadores na avaliação dos esfregaços citológicos, particularmente daqueles de significado indeterminado e de baixo grau (Stoler *et al.*, 2001). A citologia oncótica é o principal método de rastreamento do câncer cervical, entretanto, apresenta limitações, pois a taxa de resultados falso-negativos gira em torno de 50% (INCA, 2010). Os resultados falso-negativos ocorrem principalmente

devido a erro de coleta, de escrutínio e de interpretação (Tavares *et al.*, 2007). Além disso, a divergência entre a elevada prevalência da infecção pelo HPV e a baixa ocorrência de anormalidades citológicas no presente estudo, corrobora o fato conhecido de que a infecção pelo HPV é causa necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento de anormalidades citológicas (Castellsague & Muñoz, 2003; Richardson *et al.*, 2003). Já a evolução para o câncer cervical ocorre em uma pequena fração, cerca de 1%, das mulheres infectadas por vírus de alto risco oncogênico (Arends *et al.*, 1998; Nicolau, 2002; Richardson *et al.*, 2003; Wolschick *et al.*, 2007, Dehn *et al.*, 2007; Lipy 2008). Outro fato a ser considerado refere-se ao tamanho amostral, que não foi suficiente para o cálculo da prevalência de anormalidades citológicas, como mostra o intervalo de confiança. Apesar dos dados de literatura ressaltarem a falta de representatividade de elementos celulares da junção escamo-colunar como a principal causa de falso-negativos citológico (Joste *et al.*, 1995), no presente estudo os quatro esfregaços foram considerados insatisfatórios pela presença de sangue e piócitos. Desta forma, a possibilidade de erro de avaliação citológica não pode ser descartada.

A paridade, o tabagismo, e o uso de anticoncepcionais orais a longo prazo são fatores que podem modular o risco de progressão da infecção pelo HPV para HSIL e câncer cervical (Castellsague & Muñoz, 2003). O hábito de fumar tem sido relacionado com a maior persistência da infecção pelo HPV e com a neoplasia pré-invasiva e invasiva (Sellors *et al.*, 2003; Murta *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2008; Guarisi, 2008; Rama *et al.*, 2008). Todavia, no presente estudo, nenhuma das variáveis estudadas apresentou associação estatisticamente significativa com a ocorrência de anormalidades citológicas. O fato pode ser explicado pela baixa prevalência de tabagismo, da multiparidade, pelo pequeno número de usuárias de contraceptivos hormonais, bem como pelo uso por curto prazo uma vez que a faixa etária estudada foi composta por mulheres jovens.

Em conclusão, o presente estudo fornece a primeira estimativa regional, no estado de Goiás, sobre a prevalência da infecção pelo HPV (39,3%) entre estudantes universitárias com idades entre 18 e 25 anos. A elevada prevalência da infecção nesta faixa de idade e neste nível sócio-econômico e cultural, identifica um segmento da população que provavelmente se beneficiará com o emprego da vacinação profilática contra o HPV.

## 7 CONCLUSÕES

1. A prevalência da infecção pelo HPV em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade, na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás, foi elevada.

2. Os fatores associados à infecção pelo HPV em estudantes universitárias na faixa etária de 18 a 25 anos de idade na região de São Luís de Montes Belos, no estado de Goiás, foram o início da atividade sexual até os 15 anos de idade e o número de parceiros sexuais acima de três.

3. Nenhum dos fatores de risco avaliados apresentou associação estatisticamente significativa com anormalidades citológicas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, R.; GUPTA; S.; NIJHAWAN; R.; SURI; V.; KAUR; A.; BHASIN; V.; ARORA; S. K. Prevalence of high-risk human papillomavirus infections in women with benign cervical cytology: A hospital based study from North India. *Indian Journal of Cancer*. vol. 43 (3): pp-pp. 2006.

AL-DARAJI, W. I.; SMITH; J. H. F. Infection and Cervical Neoplasia: Facts and Fiction. *Int J Clin Exp Pathol* 2; 48-64. 2009.

ALVES, R. R. F.. Infecção do colo uterino por múltiplos tipos do papilomavírus humano em adolescentes sexualmente ativas: prevalência; fatores associados e anormalidades citológicas. Tese de Doutorado. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. 2006.

ANDERSSON-ELLSTRÖM, A.; MILSOM, I. Knowledge about the prevention of sexually transmitted diseases: a longitudinal study of young women from 16–23 years of age. *Sex Transm Infect*. 78:339–341. 2002.

ARENDS, M. J.; BUCKLEY; C. H.; WELLS; M. A etiology; pathogenesis; and pathology of cervical neoplasia. *Clin Pathol*;51:96-103. 1998.

AULT, K.A. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. Hindawi Publishing Corporation *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Volume; Article ID 40470; Pages 1–5. 2006.

BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Human papillomavirus typing and physical state by *in situ* hybridization in uterine cervix intraepithelial lesions. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*; 26(1): 2004.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.*; 32 Suppl 1:S16-24. 2005.

BEAUDENON, S.; HUIBREGTSE, J. M. HPV E6; E6AP and cervical cancer. *BMC Biochemistry*; 9(Suppl 1):S4. 2008.

BERNARD, H. U. The clinical importance of nomenclature; evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Jornal Clin Virol*. v.32; n.1; p.1-6; 2005.

BETTINI, S. R.; SIMÕES, R. T.; RUIZ, A. C. G.; FONSECA, B. A. L.; SIMÕES, A. L.; CANAS, M. C. T.; DUARTE, G.; QUINTANA, S. M.; MARTINHAGO, C. D.; ALVES, A. A.; ROCHA, A. M. ; SOARES, E. G. Absolute Quantification of Gene E7 in Cervical Samples of Women Infected by HPV Using Real Time PCR. *Applied Cancer Research*; Volume 28; Number 2; 2008.

BOSCH, F. X; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C. J.; SHAH, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55(4):244-65; 2002.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Chapter 1: Human Papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 31: 3-13. 2003.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Int Cancer Inst.* 87: 796-802; 1995.

BRENNAN, S. M. F.; SYRJANEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *São Paulo Med. J.*; São Paulo; v. 121; n. 3; 2003.

BROWN, D. R.; FIFE, K. H. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Med Clin North Am*; 74:1455-85. 1990.

BROWN, D. R.; SHEW, M. L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU W.; JULIAR, B. E.; BREEN, T. E.; FORTENBERRY, J. D. A Longitudinal Study of Genital Human Papillomavirus Infection in a Cohort of Closely Followed Adolescent Women. *J Infect Dis.* January 15; 191(2): 182–192. 2005.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.*; 16(1):1-17. 2003.

BURK, R. D.; KELLY, P.; FELDMAN, J.; BROMBERG, J.; VERMUND, S. H.; DEHOVITZ J. A. *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*; 23(4):333-41; 1996.

CAMPOS, A. C. C.; FREITAS-JÚNIOR, R.; POLETTO, K. Q.; GOULART, E. F.; RIBEIRO, L. F. J; PAULINELLI, R. R.; REIS, C. Risk factors associated with cellular alterations induced by the human papilloma virus in the uterine cervix. *Rev. Ciênc. Méd.*; Campinas; 17(3-6):133-140; maio/dez.; 2008.

CARMO, E. F. S. DO; FIORINI, A. Principal molecular techniques for detecting human papillomavirus. *SaBios-Rev. Saúde e Biol.*; v. 2; n. 1 p. 29-31. 2007.

CARVALHO, M. O. O.; CARESTIATO, F. N.; PERDIGÃO, P. H.; XAVIER, M. P. P. T.; SILVA, K. C; BOTELHO, M. O; OLIVEIRA, L. H. S; CAVALCANTI, S. M. B. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro; Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis* vol.9 no.5 Salvador Oct.2005.

CASTELLSAGUE, X.; BOSCH, F. X; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 89(2): 191-199. 2002.

CASTELLSAGUE, X.; MUÑOZ, N.. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity; oral contraceptives; and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 31:20-8; 2003.

CASTRO, T. M. P. G.; R. NETO, C. E.; SCALA, KA. Oral manifestations related to papillomavirus (hpv). Rev. Bras. Otorrinolaringol; vol. 70; no. 4; pp. 546-550. 2004.

CASTRO T. P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. Rev. Bras. Otorrinolaringol; São Paulo; v. 72; n. 2; 2006.

CAVALCANTE, V. L. N. Papilomavírus humano (HPV) e co-fatores de risco em mulheres submetidas a rastreamento para câncer de cérvix uterina. Unidade materno-infantil do Marco. Belém; Pará; Brasil. Tese de Doutorado em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro. 2007.

CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F. N. Human papillomavirus infection: update on virological and epidemiological aspects and diagnosis. DST – J bras Doenças Sex Transm 18(1): 73-79; 2006.

CHANG, F. Role of papillomaviruses. J Clin Pathol; 43: 269-76. 1990.

CLIFFORD, G. M.; SHIN, H. R.; OH J. K.; WATERBOER, T.; JU Y. H.; VACCARELLA, S.; QUINT, W.; PAWLITA, M.; FRANCESCHI, S. Serologic Response to Oncogenic Human Papillomavirus Types in Male and Female University Students in Busan; South Korea. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 16(9). September 2007.

CUSCHIERI, K. S.; CUBIE, H. A.; WHITLEY, M. W.; SEAGAR, A. L.; ARENDS, M. J.; MOORE C.; GILKISSON G.; MCGOOGAN E. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. J Clin Pathol; 57:68–72. 2004.

DATTA, P.; PATRO, R. K.; BHATLA, N.; SINGH, N. Prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in a cohort of young women in Delhi; Índia. *The FASEB Journal*. 22:898.12. 2008.

DE SANJOSÉ, S.; DIAZ M.; CASTELLSAGUE, X. *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis; 7: 453-9. 2007.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. Virology. 324: 17-27. 2004.

DEHN, D.; TORKKO, K. C.; SHROYER, K. R. Human Papillomavirus Testing and Molecular Markers of Cervical Dysplasia and Carcinoma. Cancer (Cancer Cytopathology) February 25 / Volume 111 / Number 1. 2007.

DERCHAIN, S. F. M.; PINTO NETO, A. M.; OLIVEIRA, R. L. C.; SANTOS, C. C.; PINTO E SILVA, J. L. C. Infecção por papilomavírus humano e neoplasia intra-epitelial cervical em adolescentes. J Bras Ginecol; 101:499-503. 1991.

DIÓGENES, M. A. R.; VARELA, Z. M. DE V. E BARROSO, G. T. Papillomavirus humano: repercussão na saúde da mulher no contexto familiar. Rev. gaúcha enferm.; jun.; vol.27; no.2; p.266-273. 2006.

DUNNE, E. F.; UNGER, E. R.; STERNBERG, M.; MCQUILLAN, G.; SWAN, D. C.; PATEL, S. S.; MARKOWITZ, L. E. Prevalence of HPV Infection Among Females in the United States. *JAMA*. 297:813-819. 2007.

DURSUN, P; SENGER, S. S.; ARSLAN, H.; KUŞÇU, E.; AYHAN, A. Human papillomavirus (HPV) prevalence and types among Turkish women at a gynecology outpatient unit. *BMC Infect Dis*. 30;9:191. Nov; 2009.

FEDRIZZI, E. N.; SCHLUP, C. G.; MENEZES, M. E.; OCAMPOS, M. Human Papillomavirus (HPV) infection in women of Florianópolis; Santa Catarina; Brazil. *DST – J bras Doenças Sex Transm*; 20(2): 73-79. 2008.

FERNANDES, T. A. A. M.; MEISSNER, R. V.; BEZERRA, L. F.; AZEVEDO, P. R. M.; DE FERNANDES, J. V. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal; Brazil. *Braz. J. Microbiol.* vol.39 no.3 São Paulo July/Sept. 2008.

FLORES, Y. N.; BISHAI, D. M.; SHAH, K. V.; LAZCANO-PONCE, E.; LÖRINGZ, A.; HERNÁNDEZ, M. *et al.* Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud pública Méx* v.50 n.1 Cuernavaca jan./fev. 50(1): 49-58. 2008.

FRANCO, E. L. Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 31: 89-96; 2003.

FRANCO, E. L.; HARPER, D. M. Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical control. *Vaccine*; 23: 2388-94. 2005.

FU XI, L.; CARTER, J. J.; GALLOWAY, D. A.; KUYPERS, J.; HUGHES, J. P.; LEE, S. K.; ADAM, D. E.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, A. Acquisition and Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Variant Infection among a Cohort of Female University Students. *Cancer Epidemiology; Biomarkers & Prevention*. 11: 343–351. 2002.

GARNETT, T. O.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Arch Virol*. 151(12): 2321–2335. December 2006.

GIULIANO, A. R.; SEDJO, R. L.; ROE, D. J.; HARRIS, R.; BALDWIN, S.; PAPPENFUSS, M. R.; *et al.* Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States). *Cancer Causes Control*. 13(9):839-46. 2002.

GNANAMONY, M.; PEEDICAYIL, A.; ABRAHAM, P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. *Indian Journal of Medical Microbiology*. vol. 25; nº 1. 2007.

GONTIJO, R. C.; DERCHAIN, S. F. M.; MONTEMOR, E. B. L.; SARIAN, L. O. Z.; SERRA, M. M. P.; ZEFERINO, L. C. K.; SYRJANEN. Pap smear; hybrid capture II; and visual inspection in screening for uterine cervical lesions. *Cad. Saúde Pública* vol.21 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb.2005.

GUARISI, R. Tabagismo, infecção pelo Papilomavírus humano e o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2008.

HERRERO, R.; BRINTON, L. A.; REEVES, W. C.; *et al.* Invasive cervical cancer and smoking in Latin America. *J Natl Cancer Inst*; 8:205-11. 1989.

HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; BRATTI, C.; *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst*. 92: 464–474. 2000.

HO G. Y. F.; BIERMAN R.; BEARDSLEY L.; CHANG C. J.; BURK R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine*;338:423-8. Vol 338 Number 7. 2008.

HOORY, T.; MONIE, A.; GRAVITT, P.; *et al.* Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med. Assoc.*; v. 107; n. 3. 2008.

HUBBARD, R. A. Human Papillomavirus Testing Methods, *Arch Pathol Lab Med*. 127:940-945. 2003.

IFTNER, T.; VILLA, L. L. Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies. *J Natl Canc Inst Monographs*. 31:80-88; 2003.

IGANSI, C. N. Prevalência de Papilomavirus humano (HPV) e Chlamydia tracomatis (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre; RS. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas de incidência de câncer no Brasil 2010. Disponível na rede em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf> Acessado em 2010.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer. Colo do útero. Diagnóstico. Disponível na rede em [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao). Acessado em 2010.

JOHNSON, K. Periodic Health Examination; 1995 Update: 1. Screening for Human Papillomavirus Infection in Assymtomatic Women. *CAN MED ASSOC J*. FEB. 15; 1152 (4). 1995.

JUSTE, N. E.; CRUM, C.; CIBAS, E. S. Cytologic/histologic correlation for quality control in cervicovaginal: Experience with 1582 paired cases. *Am. J. Clin. Pathol*. 32: 32-34. 1995.

KAHN, J. A.; ROSENTHAL, S. L.; SUCCOP, P. A.; HO, G. Y.; BURK, R. D. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *J Pediatr*.141(5):718-23. 2002.

KJAER, S. K.; BRULE, A. J. C VAN, DE.; BOCK, J. E.; POLL, P. A.; Engholm G; Sherman ME; Walboormers JMM; Meijer CJL. Determinants for Genital Human Papillomavirus (HPV) Infection in 1000 Randomly Chosen Young Danish Women with Normal Pap Smear: Are There Different Risk Profiles for Oncogenic and Nononcogenic HPV Types? *Cancer Epidemiology; Biomarkers & Prevention*. Vol. 6; 799-805; October 1997.

KJAER, S. K.; BRULE, A. J. C. VAN, DEN; PAULL, G.; SVARE, E. I.; SHERMAN, M. E.; THOMSEN, B. L.; SUNTUM, M.; BOCK, J. E.; POLL, A. P.; MEIJER, C. J. L. M. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *bmj.com*; 325:572. 2002.

KORNEGAY, J. R.; ROGER, M.; DAVIES, P O.; SHEPARD, A. P.; GUERRERO, N. A.; LLOVERAS, B.; EVANS, D.; COUTLÉE, F. International Proficiency Study of a Consensus L1 PCR Assay for the Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA: Evaluation of Accuracy and Intralaboratory and Interlaboratory Agreement. *J. Clin. Microbiol*; p. 1080–1086. Vol. 41; No. 3. Mar. 2003.

KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*; v. 102; n. 5A; p. 3-8. 1997.

LENSELINK, C. H.; MELCHERS, W. J. G.; QUINT, W. G. V.; HOEBERS, A. M. J.; HENDRIKS, J. C. M.; MASSUGER, L. F. A. G.; BEKKERS, R. L. M. Sexual Behaviour and HPV Infections in 18 to 29 Year Old Women in the Pre-Vaccine Era in the Netherlands. *PLoS ONE* 3(11): e3743. doi:10.1371/journal.pone.0003743. 2008.

LEY, C.; BAUER, H. M.; REINGOLD, A.; *et al.* Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst*; 83:997-1003. 1991.

LIMA, F. C. Comparação de diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de HPV em mulheres HIV positivas e HIV negativas. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Genética. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2009.

LIPSY, R. J. Assessing the Short-term and Long-term Burden of Illness in Cervical Cancer. *Am J Manag Care*.14:S177-S184). 2008.

LONGATTO FILHO, A.; ERTLINGER, D.; GOMES, N. S.; CRUZ, S. V. & CAVALIERI, M. J. Frequência de esfregaços cérvico-vaginais anormais em adolescentes e adultas: revisão de 308.630 casos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v. 62; no. 1; p. 31-34. 2003.

MANDIC, A. & VUJKOV, T. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? Institute of Oncology; Sremska Kamenica; Yugoslávia. *Annals of Oncology* 15: 197–200. 2004.

MANHART, L. E.; HOLMES, K. K.; KOUTSKY, L. A.; WOOD, T. R.; KENNEDY, D. L.; FENG, Q.; *et al.* Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: implications for developing a vaccination strategy. *Sex Transm Dis*;33(8):502 – 8. 2006.

MEDEIROS, V. C. R. D.; MEDEIROS, R. C.; MORAES, L. M.; MENEZES, J. B.; RAMOS, E. S. N.; SATURNINO, A. C. R. D.. Uterine cervix câncer: analysis of epidemiological and cytopathological in the state of Rio Grande do Norte. RBAC; vol. 37(4): 227-231; 2005.

MENDONÇA, M. L.; NETTO, J. C. A. Importância da Infecção pelo Papilomavírus Humano em Pacientes do Sexo Masculino. DST – J bras Doenças Sex Transm 17(4): 306-310. 2005.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT W.; VAN DOORN L. J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. Journal of Clinical Virology; v. 32; p. 43-51. 2005.

MOSCICKI, A-B.; HILLS, N.; SHIBOSKI, S.; POWELL, K.; JAY N.; HANSON, E.; MILLER, S.; LAYTON, L.; FARHAT, S.; DARRAGH, T.; PALEFSKY, J.. BROERING, G. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. JAMA. 285: 2995-3002. 2001

MOSCICKI, A-B.; SHIBOSKI, S.; BROERING, J.; POWEL, K.; CLAYTON, L.; JAY, NAOMI; DARRAGH, T. M.; BRESCIA, R.; KANOWITZ, S.; MILLER, S.; STONE, J.; HANSON, E.; PALEFSKY, J. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. J Pediatr. 132: 277-284. 1998.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 24 (3): 3-10. 2006.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; CASTELLSAGUE, X.; DÍAZ M.; DE SANJOSÉ, S. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. Int J Cancer. 111:278-285. 2004.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH K. V. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med; 348: 518-27. 2003.

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J. S.; *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet; 359:1085-92. 2002.

MURTA, E. F. C.; LOMBARDI, W.; BORGES, L. S.; SOUZA, M A. H; ADAD, S. J. Freqüência da infecção pelo papilomavírus humano em mulheres com ectopia cervical. Rev Bras Ginecol Obstet;21(8):447-9. 1999.

MURTA, E. F. C.; SOUZA, M. A. H.; ADAD, S. J.; ARAÚJO JÚNIOR, E. Infecção pelo Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação com o Método Anticoncepcional; Gravidez; Fumo e Achados Citológicos. Rev. Bras. Ginecol. Obstet.; Rio de Janeiro. 23(4). 2001.

NASCIMENTO, M. I.; PIRES, E. S.; GIL, D. Q.; NUNES, G. G.; BALBOA, V.; STASLAKI, F. V. & CUNHA, A. A. Características de um grupo de adolescentes com

suspeita de neoplasia intra-epitelial cervical. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 27(10): 619-626. 2005.

NASCIMENTO, V. T.; VARGA, V. R. A. Atypical cytologic frequency in adolescents in the Laboratory Osvaldo Cruz; Santo Ângelo City . RS. Rev. Bras. Farm.; 89(4): 347-351; 2008.

NICOLAU, S. M. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. 11 de setembro de 2002.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L.; PROLLA, J C.; BOZZETTI, M. C. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. Rev Saúde Pública; 36(1):95-100. 2002.

NORONHA, V. L.; NORONHA, R.; CARMONA, B; MACEDO, L. A.; CRUZ, E. M.; NAUM, C.; MELLO, W; VILLA, L. Human Papilomavirus of women with oncotic cytologic normal. DST – J bras Doenças Sex Transm 17(1): 49-55. 2005.

NOVAES, L. C. G; *et al.* Biologia molecular dos papilomavírus humanos e sua participação na carcinogênese. Revista Saúde Distrito Federal. Brasília; v.13; n.3; p.29-36; julho-dezembro; 2002.

NOVAES, L. C. G.; NOVAES, M. R. C. G.; SIMÕES-BARBOSA, A. Diagnosis of human papillomatosis by polymerase chain reaction in cases of divergence between results of hybrid capture and papanicolaou cytology. Braz J Infect Dis. 10(3):169-172. 2006.

NYÁRI, T.; CSEH, I.; WOODWARD, M.; SZÖLLÖSI, J.; BAK, M.; DEÁK, J. Screening for human papillomavirus infection in asymptomatic women in Hungary. Human Reproduction. 16(10): 2235-2237. 2001.

OH, J. K.; JU, Y. H.; FRANCESCHI, S.; QUINT, W.; SHIN, H. R. Acquisition of new infection and clearance of type-specific human papillomavirus infections in female students in Busan; South Korea: a follow-up study. BMC Infectious Diseases. 8:13. 2008.

OLIVEIRA, L. H. S.; FERREIRA, M D. P. L; AUGUSTO, E. F.; MELGAÇO, F. G.; SANTOS, L. S.; CAVALCANTI, S M. B.; ROSA, M. L. G. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro; Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 43(1). Uberaba Jan./Feb. 2010.

OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. L. L.. HPV and oral carcinogenesis: a bibliographic review. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 69(4). São Paulo. 2003.

ÖSTOR, A. G.. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. Int J Gynecol Pathol.12(2):186-92. 1993.

PALEFSKY, J. Biology of HPV in HIV Infection. Adv Dent Res. 19:99-105; 2006.

PEREIRA, S. M. M.; UTAGAWA, M. L.; MAEDA, M. Y. S.; PITTOLI, J. E.; AGUIAR, L. S.; LONGATTO, FILHO A.. Implantação do teste de captura de híbridos no Instituto Adolfo Lutz. Bol Inst Adolfo Lutz 13(1): 4; 2003.

PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA C. I.; CHUERY, A. C. S. Papilomavírus humano. In: Conhecendo o HPV. Patologia do trato genital inferior. Colposcopia e CAF. Collectanea Symposium. São Paulo, Frôntis Editorial. 2000.

PINTO, A. P.; SIUMARA, T.; CRUZ, O R.. HPV Cofactors in cervical carcinogenesis. Rev. Assoc. Med. Bras.; São Paulo. 48(1). 2002.

POPPE, W. A.; DRIJKONINGEN, M.; IDE P. S.; LAWERYNS, J M.; VAN ASSCHE, F. A. Langerhans' cells and L1 antigen expression in normal e abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. Gynecol Obstet Invest; 41(3):207-13. 1996.

QUEIROZ, A. M. A.; CANO, M. A. T.; ZAIA, J. E. Papiloma human virus (HPV) in women taken care of for the SUS; the city of Patos de Minas – MG. RBAC; vol. 39(2): 151-157; 2007.

RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; AMARAL, R. G.; MAGALHÃES, A. V. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania; Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98: 181-184. 2003.

RAMA, C. H. Idade e prevalência da infecção genital por papilomavirus humano de alto risco em mulheres submetidas a rastreamento para o câncer cervical. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo. 2006.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; , E. Z.; ALDRIGHI, J. M.; NETO, C. M.. Serological detection of anti HPV 16/18 and its association with pap smear in adolescents and young women. Rev. Assoc. Med. Bras. 52(1). São Paulo Jan./Feb. 2006.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L.; OTÁVIO, Z. Prevalence of genital HPV infection among women screened for cervical câncer. Rev Saúde Pública;42(1):123:30. 2008.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L.; *et al.* Previous screening for cervical cancer among women with cytological and histological abnormalities. Rev Saúde Pública 42(3):411-9. 2008.

RICHARDSON, H.; KELSALL, G.; TELLIER, P.; VOYER, H.; ABRAHAMOWICZ, M.; FERENCZY, A.; COUtlÉE, F.; FRANCO, E. L. The Natural History of Type-specific Human Papillomavirus Infections in Female University Students. Cancer Epidemiology; Biomarkers & Prevention. 12: 485–490. June; 2003.

RICHARDSON, H.; FRANCO, E.; PINTOS, J.; BERGERON, J.; ARELLA, M.; TELLIER, P. Determinants of low-risk and high-risk cervical human papillomavirus infections in Montreal University students. *Sex Transm Dis*; 27(2):79-86; 2000.

ROGAZY M. C. Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Rev Chil Infect*; 24 (3): 209-214. 2007.

ROSA, MARIA INÊS DA; MEDEIROS LÍDIA ROSI; ROSA, DANIELA DORNELLES; BOZZETI, MARY CLARISSE; SILVA FÁBIO ROSA; SILVA BRUNO ROSA. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*; Rio de Janeiro. 25(5). 2009.

ROUSSEAU, M. C.; ABRAHAMOWICZ, M.; VILLA, L. L.; COSTA, M. C.; ROHAN, T E.; FRANCO, E. L. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Câncer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(10):1029-37. Oct; 2003.

SALVIA, P. N. D. Correlação entre critérios morfológicos, citológicos e histológicos e presença do DNA do papilomavirus humano em biópsias cervicais uterinas detectado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas. 2004.

SARIAN, L. O. Z.; SANTOS, A. L. F.; DERCHAIN, S. F. M.; FIGUEREIDO, P. G.; MORAIS, S. S.. Viral load of human papillomavirus as a predictor of the severity of cervical lesions in women with atypical cells at pap smear. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. vol. 25 no.5. Rio de Janeiro. June; 2003.

SCHIFFMAN, M. Integration of Human Papillomavirus Vaccination; Cytology; and Human Papillomavirus Testing. *Cancer (Cancer Cytopathology)*. 111(3). June 25. 2007.

SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R. A. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*; 286:3106-14. 2001.

SELLORS, J. W.; KARWALAJTYS, T. L.; KACZOROWSKI, J.; MAHONY J. B.; LYTWYN A.; CHONG S.; SPARROW J.; LORINCZ A. Incidence; clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *CMAJ*. 168 (4). FEB. 18; 2003.

SELLORS, J. W.; MAHONY, J. B.; KACZOROWSKI, J.; LYTWYN, A.; BANGURA, H.; CHONG, S.; LORINCZ, A.; DALBY, D. M.; JANJUSEVIC, V.; KELLER, J. L. and The Survey of HPV in Ontario Women (SHOW) Group. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario; Canadá. *CMAJ*; 163 (5). September 5; 2000.

SHEARY, B.; DAYAN, L.. Cervical screening and human papillomavirus. *Australian Family Physician* Vol. 34; No. 7; July 2005.

SHEW, M. L.; FORTENBERRY, J. D.; TU W.; JULIAR, E. B.; BATTEIGER, E. B.; QUADADRI, B.; BROWN, D. R. Association of condom use; sexual behaviors; and

sexually transmitted Infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 160: 151-156. 2006.

SILVA, A. M. T. C.; CRUZ, A. D.; SILVA, C. C.; BORGES, F. R.; CURADO, M. P.. Genotyping of Human Papillomavirus in patient with recurrent laryngeal papilomatose. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 49(3): 167-174. 2003.

SILVA, T. T.; GUIMARÃES, M. L.; BARBOSA, M. I. C.; PINHEIRO, M. F. G.; MAIA, A. F.. Identification of papillomavirus types and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 28(5). Rio de Janeiro. 2006.

SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287(16):2114-9. 2002.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 51(2): 155-160. 2005.

SOUZA, E. P. Epidemiologia da infecção genital por HPV e anormalidades na citologia cervical em mulheres jovens brasileiras. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2004.

STAMATAKI, P.; PAPAZAFIROPOULOU, A.; ELEFSINIOTIS, I.; GIANNAKOPOULOU, M.; BROKALAKI, H.; APOSTOLOPOULOU, E.; SARAFIS, P.; SAROGLU, G.. Prevalence of HPV infection among Greek women attending a gynecological outpatient clinic. *BMC Infect Dis.* 10: 27. 2010.

STEINER. M. J.; WILLARD. JR C. Condoms and sexually-transmitted infections. *N Engl J Med.* 354: 2642-2643. 2006.

STOLER, M.; SCHIFFMAN, M. For the ALTS group: Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histological interpretations: Realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 285:1500-1505. 2001.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A.. Human Papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biol.*9:379-86. 1999.

TAVARES, S. B. N.; AMARAL, R. G.; MANRIQUE, E. J. C.; SOUSA, N. L. A.; ALBUQUERQUE, Z. B. P.; ZEFERINO, L. C. Quality Control in Cervical Cytopathology: a Literature Review. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 53(3): 355-364. 2007

TIAGO, D. B. Avaliação de alguns fatores de risco femininos e masculinos no resultado da peniscopia dos parceiros sexuais de mulheres com infecção pelo papilomavírus humano. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 2001.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*; v. 24; supl. 1; p. S1-15. 2006.

TROTTIER, H.; MAHMUD, S.; COSTA, M. C.; SOBRINHO, J. P.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L.. Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(7). 2006.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol.* 153:397–408. 2008.

VAN DOORN, L. J.; KLETER, B.; QUINT, W. G. Molecular detection and genotyping of human papillomavirus. *Expert Rev Mol Diagn*; 1(4):394-402. 2001.

VILLA, L. L.; SICHERO, L.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.; FERENCZY, A.; ROHAN, T. *et al.* Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*; 81(Pt 12):2959-68. 2000.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res.* 71: 321-341. 1997.

VILLA, L. L. O papel do papilomavirus na neoplasia genital feminina. In: Abraão FS. *Oncologia Genital Feminina e Mamária*. 1ª ed. São Paulo. Ed. Roca; p. 39-48; 1995.

WALBOOMERS, J. M. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189: 12-19. 1999.

WINER, R. L.; HUGHES, J. P.; FENG, Q.; O'REILLY, S.; KIVIAT, N. B.; HOLMES, K. K.; KOUTSKY, L. A. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 354: 2645-2654. 2006

WINER, R. L.; LEE, S-K.; HUGHES, JP; ADAM, D. E.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, L. A. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. *Am J Epidemiol.* 1;157(3):218-26. Feb; 2003.

WOLF, J. K.; FRANCO, E. L.; ARBEIT, J. M.; SHROYER, K. R.; WU, T; RUNOWICZ, C. D.; TORTOLERO-LUNA, G.; HERRERO, R.; CRUM, C. P. Innovations in Understanding the Biology of Cervical Cancer. Second International Conference on Cervical Câncer. *CANCER Supplement / Volume 98 / Number 9.* November 1; 2003.

WOLSCHICK, N. M.; CONSOLARO, M. E. L.; SUZUKI, L. E.; BOER, C. G. Cervical uterine cancer: emerging technologies on the diagnosis; treatment and disease prevention. *RBAC*; vol. 39(2): 123-129; 2007.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S.; WINTER, H.; ANDREW, B.; ELLIS, J.; PRIOR, P.; YATES, M.; ROLLASON, T. P.; YOUNG, L. S. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 357: 1831-1836. 2001.

WRIGHT JR, T. C.; MASSAD, L. S.; DUNTON, C. J.; SPITZER, M.; WILKINSON, E. J.; SOLOMON, D. 2006 consensus guidelines for the management of women with

abnormal cervical cancer screening tests. American Journal of Obstetrics & Gynecology; october; 2007.

ZEFERINO, L. C.; AMARAL, R. G.; DUFLOTH, R. M. HPV e a neoplasia do colo do útero. Femina. 30:471-5. 2002.

ZUR HAUSEN, H.; Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer. 2(5): 342-350. 2002.

## **ANEXO**

**ANEXO 1: Aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa****PROTOCOLO CEPACCG Nº 014/08****Goiânia, 08/05/2008****INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Mestranda - Rosângela Nazareth Pereira****Orientadora:** Dra. Vera Aparecida Saddi**TÍTULO:** “Detecção e Genotipagem do Papilomavirus Humano (HPV) em Adultas Jovens, de 18 a 25 anos, em São Luis de Montes Belos/GO.”**Área Temática:** Grupo I – Genética Humana**Local de Realização:** Universidade Católica de Goiás/Núcleo de Pesquisa Replicon

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

Após iniciar a pesquisa, o Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/ACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

**DRA. JULIANA CASTRO DOURADO PINEZI**  
Coordenadora do CEPACCG

## **APÊNDICES**

**Universidade Católica de Goiás**  
**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa**  
**Departamento de Biologia – Mestrado em Genética**

**APÊNDICE 1:**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidada para participar; como voluntária; em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir e no caso de aceitar fazer parte do estudo; assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias; uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa; você deverá entrar em contato com o pesquisador responsável: Rosângela Nazareth Pereira nos telefones: (64)3671-5174 e (64)8423-5535. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa; você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa; no telefone (62)3243-7050.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Título do Projeto: DETECÇÃO DO GENOMA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS, COM IDADES ENTRE 18 E 25 ANOS, DA REGIÃO DE SÃO LUÍS DE MONTES BELOS – GOIÁS**

Pesquisador Responsável: Rosângela Nazareth Pereira

Orientadora: Vera Aparecida Saddi

Pesquisadores colaboradores: Domingos Ribeiro Casimiro (médico); Sílvia Helena Rabelo (Farmacêutica); Rosane Ribeiro F. Alves (médica)

Meu nome é Rosângela Nazareth Pereira; sou farmacêutica-bioquímica; professora da Faculdade Montes Belos; na região de São Luís de Montes Belos-GO; mestranda em Genética da Universidade Católica de Goiás e responsável pela pesquisa a ser realizada.

Descrição da pesquisa; objetivos; procedimentos; forma de acompanhamento:

Está comprovado que o câncer de colo uterino ocorre em mulheres com infecção persistente por um vírus chamado Papilomavírus Humano (HPV). O HPV é um vírus de transmissão sexual muito comum na população. Na maioria das vezes; a infecção não

apresenta nenhum sintoma e desaparece por ação do sistema imunológico; mas em algumas mulheres; a infecção pode provocar alterações nas células e persistir por anos. Nestas mulheres; o risco de câncer cervical está aumentado. A detecção das lesões precursoras do câncer permite seu tratamento precoce.

O presente estudo visa analisar a distribuição dos tipos de HPV identificados em adultas jovens; com idades entre 18 e 25 anos; com vida sexual ativa; residentes na cidade de São Luís de Montes Belos. Visa ainda avaliar as possíveis correlações existentes entre a infecção pelo HPV; no grupo de jovens analisadas; e seus hábitos sexuais (número de parceiros; início da atividade sexual; uso de preservativos; etc.).

Objetivo: Avaliar a prevalência das infecções pelo HPV e os genótipos virais mais comuns em um grupo de adultas jovens; sexualmente ativas; atendidas no Ambulatório de Enfermagem da Faculdade Montes Belos; em São Luís de Montes Belos-GO.

Metodologia: Após concordar em participar do projeto; você deverá assinar um consentimento escrito. Só então; será encaminhada e atendida no Ambulatório de Enfermagem da Faculdade Montes Belos; onde deverá responder a um questionário sobre dados pessoais e hábitos de vida. Só então será submetida ao exame clínico de inspeção dos órgãos genitais e coleta esfoliativa de material do colo de útero; pelo médico colaborador do projeto; Dr<sup>o</sup>. Domingos Ribeiro Casimiro; que será usada para o exame citológico e para a detecção do genoma viral.

Os riscos e desconfortos deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima; ou seja; a coleta de material para o exame citológico poderá de modo pouco freqüente; causar um pequeno sangramento local; que cessará espontaneamente.

Como benefício indireto você estará contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução.

Não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira caso você concorde em participar do estudo; bem como não terá nenhum custo relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

Em caso de dúvida sobre o direito de pleitear indenização em caso de danos decorrentes de sua participação na pesquisa; você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Araújo Jorge; em Goiânia-GO; no telefone (62) 3243-7050.

Os seus dados pessoais serão mantidos sob absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente para fins científicos; apenas para essa pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros; podendo ser publicados em revistas e jornais especializados.

O projeto tem duração doze meses e deverá ser concluído até o mês de Março de 2009. Sua participação no projeto deve durar cerca de 60 minutos; constando de resposta a um questionário e a coleta de material do colo de útero.

Você tem garantia expressa de liberdade de não aceitação; bem como de retirar o seu consentimento escrito e se desligar da pesquisa em qualquer fase que julgar necessária.

---

**Rosângela Nazareth Pereira**

CPF: 394.522.631-72

Telefone: (64) 8423-5535

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu; \_\_\_\_\_; RG/ CPF/ nº. de matrícula \_\_\_\_\_; abaixo assinado; concordo em participar do estudo: “DETECÇÃO DO GENOMA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS, COM IDADES ENTRE 18 E 25 ANOS, DA REGIÃO DE SÃO LUÍS DE MONTES BELOS – GOIÁS”; como sujeito voluntário. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora Rosângela Nazareth Pereira; sobre a pesquisa; os procedimentos nela envolvidos; assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento; sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento / assistência.

Local e data

---

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

---

**Presenciamos a solicitação de consentimento; esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar**

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Universidade Católica de Goiás.  
Mestrado em Genética  
Projeto: Detecção do Genoma do Papilomavírus Humano (HPV)  
em adultas jovens**

**APÊNDICE 2:**

**QUESTIONÁRIO**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

Estado civil: (1) solteira (2) casada (3) Outro: \_\_\_\_\_

Profissão \_\_\_\_\_ Renda familiar mensal: \_\_\_\_\_

Escolaridade: (1) I Grau (2) II Grau (3) III Grau

Raça/Cor: (1) Branca (2) Parda (3) Negra

Idade da 1ª relação sexual: \_\_\_\_\_ Paridade: \_\_\_\_\_

Nº de parceiros sexuais nos últimos 6 meses: \_\_\_\_\_

Nº de parceiros durante a vida sexual: \_\_\_\_\_

Orientação sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Bissexual

Tabagismo: (1) Sim (2) Não

Se sim; tempo de tabagismo (anos): (1) 1-9anos (2)  $\geq 10$  anos

Consumo diário: (1) 1-19 cigarros (2)  $\geq 20$  cigarros

Uso de anticoncepcional oral: (1) Sim (2) Não

Usa outro tipo de método contraceptivo: (1) Sim Qual? \_\_\_\_\_ (2) Não

Uso de preservativos: (1) frequentemente (2) Ocasionalmente (3) Raramente

Já foi no ginecologista? (1) Sim (2) Não Periodicidade: \_\_\_\_\_

Já foi tratada com algum tipo de DST? (1) Sim (2) Não

Qual? \_\_\_\_\_

Faz o exame preventivo regularmente? (1) Sim (2) Não

Data do último exame ginecológico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ PSF: \_\_\_\_\_

Enf. Resp. \_\_\_\_\_

Os dados dessa ficha foram coletados por: \_\_\_\_\_ Em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### APÊNDICE 3:

#### DETECÇÃO MOLECULAR DO GENOMA DO HPV NOS ESPÉCIMES ENDORCERVICAIS UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR:

##### 1. Extração de DNA

O material preservado em solução-tampão preservadora (*Universal Collection Médium* – DIGENE) foi processado para extração de DNA. A extração do DNA do HPV das amostras coletadas foi feita com a utilização do kit comercial **PURE LINK INVITROGEN**, utilizando o protocolo descrito abaixo.

##### 2. Preparação do lisado de células

Antes de iniciar a extração, os tubos contendo as amostras de células cervicais foram retirados do freezer e deixados, rapidamente, à temperatura ambiente para descongelar. As amostras foram agitadas vigorosamente, por 20 segundos, no vortex, para desgrudar as células cervicais da escova (*cytobrush*). Com uma micropipeta, foram transferidos cerca de 200 µl da suspensão de células colhidas em UCM para um microtubo (1,5 ml). Cerca de 20 µl de Proteinase K (kit-Invitrogen) foram adicionados a cada microtubo e, após homogeneização, foi adicionado igual volume (220 µl) de tampão de lise (Pure Link Genomic Lysis/Binding Buffer). Os tubos foram novamente homogeneizados por meio de pipetagens sucessivas. O lisado celular foi incubado a 55°C por 30 minutos. Após os 30 minutos, os tubos foram centrifugados rapidamente (*spin down*), somente para baixar as gotículas que estivessem na tampa do tubo. Em seguida adicionou-se 200 µl de Etanol 96-100% ao lisado e então a mistura foi agitada no vortex por 5 segundos, a fim de se obter uma mistura homogênea.

##### 3. Ligação do DNA   coluna

Uma coluna foi posicionada no respectivo tubo coletor e o lisado de células foi pipetado sobre a coluna. As colunas foram centrifugadas a 10.000 rpm por um minuto, à temperatura ambiente. O líquido coletado foi descartado e a coluna reposicionada no tubo coletor.

#### 4. Lavagem do DNA aderido à coluna

A cada coluna, foram adicionados 500 µl de tampão de lavagem 1 (*Genomic Wash Buffer 1*), previamente preparado com etanol, e posteriormente, centrifugados a 10.000 rpm por um minuto, à temperatura ambiente. O líquido coletado foi descartado e a coluna foi reposicionada no microtubo coletor. Em uma segunda lavagem adicionou-se à coluna, 500 µl de tampão de lavagem 2 (*Genomic Wash Buffer 2*), previamente preparado com etanol, e o microtubo novamente centrifugado a 10.000 rpm por três minutos, à temperatura ambiente. O líquido coletado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo microtubo coletor.

#### 5. Eluição do DNA

O tubo coletor foi descartado e a coluna foi transferida para um novo microtubo coletor limpo e autoclavado e rotulado com os dados da amostra usada para extração de DNA. Após adicionar 25 µl de Tampão de Eluição (Elution Buffer) à coluna, foi incubada a temperatura ambiente por um minuto. Posteriormente, a coluna foi centrifugada a 12.000 rpm por um minuto, à temperatura ambiente. Para aumentar o rendimento da extração, repetiu-se a etapa de eluição com mais 25 µl de tampão de eluição e novamente incubada a temperatura ambiente por um minuto. Após centrifugar a 12.000 rpm por um minuto, à temperatura ambiente, a coluna foi descartada e o DNA armazenado no tubo rotulado no freezer a -20°C.

## **APÊNDICE 4: Gel de Poliacrilamida a 8% e coloração do gel por nitrato de prata**

### **Gel de Poliacrilamida a 8%**

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% e posteriormente corados com Nitrato de Prata.

O gel de poliacrilamida 8% foi preparado com 34 ml de água destilada e deionizada, 10 ml de solução de acrilamida 40%, 5 ml de TBE (tampão Tris- Borato-EDTA) 10 X concentrado. Para a polimerização foi adicionado 500 µl de persulfato de amônio a 10% e 50 µl de TEMED (tetrametiletilenodiamina).

As amostras e controles negativo e positivo foram preparadas com 10 µl do produto de amplificação, acrescido de 3 µl do tampão de corrida. Como marcador de peso molecular foi utilizado o LADDER de 50 pb. O marcador de peso molecular foi preparado com 5 µl do LADDER, acrescido de 3 µl de água milliQ e 3 µl do tampão de amostra.

Após a polimerização foram aplicados em gel cerca de 10 µl de todas as amostras. Em seguida o gel foi submetido à eletroforese, na fonte de tensão, com voltagem constante de 150 V e 150 A por 1 hora e 15 minutos, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X concentrado, pH 8,3.

### **Coloração do gel por nitrato de prata AgNO<sub>3</sub>**

Utilizamos o protocolo de coloração rápida pela prata.

Solução de Fixação: 50 mL de álcool etílico P.A., 2 mL de ácido acético, água deionizada q.s.p. 300 mL. Solução de coloração: Nitrato de Prata 15%. Solução de revelação: 15 mL de hidróxido de sódio 30%, 2 mL de formaldeído 37% e água deionizada q.s. p. 200mL. O gel era depositado em um recipiente de plástico limpo, no qual eram adicionados 150mL da solução de fixação, 2 mL de solução de coloração, agitando por 5 minutos. A Solução de Fixação era desprezada e o gel lavado com água deionizada, por 15 segundos (repetir este procedimento por duas vezes);

A solução de revelação era adicionada juntamente com 2 mL de formaldeído a 37% (no momento do uso), homogeneizando e a mistura agitada lentamente até a revelação das bandas. Em seguida era adicionado o restante da solução de fixação e o gel era colocado no secador a vácuo durante 1 hora e 45 minutos a 60°C.