

JACQUELINE CORTINHAS MONTEIRO

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)
EM MULHERES INVESTIGADAS PARA O CÂNCER CERVICAL, NA
CIDADE DE BELÉM, PARÁ.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado.

Belém-Pará
2009

JACQUELINE CORTINHAS MONTEIRO

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
MULHERES INVESTIGADAS PARA O CÂNCER CERVICAL, NA CIDADE DE
BELÉM, PARÁ.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Prof. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Seção de Arbovirologia, IEC.

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Belém, 29 de abril de 2009.

EPÍGRAFE

“Pedi força e vigor;

Deus me mandou dificuldades para me fazer forte.

Pedi sabedoria;

Deus me mandou problema para resolver.

Pedi prosperidade;

Deus me deu energia e cérebro para trabalhar.

Pedi coragem;

Deus me mandou situações para superar.

Pedi amor;

Deus me mandou pessoas com problemas para eu ajudar.

Pedi favores;

Deus me deu oportunidades.

Não recebi nada do que queria,

Recebi tudo o que precisava,

Minhas preces foram atendidas.”

Aos meus tão queridos e amados pais: Antonio Carlos Monteiro e Nazaré do Socorro Monteiro.

Ao meu irmão Diego Henrique; ao meu querido sobrinho Carlos Henrique e ao meu namorado Bruno Damasceno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu Deus misericordioso que todos os dias opera maravilhas em minha vida. E a prova maior disso é ter colocado pessoas tão especiais em meu convívio. Obrigada Senhor, por ter permitido que eu conseguisse concluir esse trabalho recebendo o apoio de todas as pessoas que me cercam.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários e ao Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde Brasileiro que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro disponibilizado através da concessão de bolsa de mestrado durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as participantes desta pesquisa sem as quais a realização desta pesquisa jamais teria sido possível.

À equipe do Laboratório de Citopatologia, especialmente ao Bené, à Carla e à Gleyciane que não mediram esforços na realização deste estudo.

Aos meus professores, Dr. Ricardo Ishak, Dra. Marluísa Ishak, Profa. Mihoko Tsutsumi e Profa. Vânia Azevedo, que sempre me incentivaram e me mostraram, com seus exemplos, que sou capaz de vencer e superar todas as minhas dificuldades. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança que em mim vocês depositaram.

Ao professor Dr. Antonio Carlos Vallinoto, por todos os momentos em que se dispôs a me ajudar, mesmo em meio a tantas tarefas e ocupações. Sem hesitar, sempre me prestou assistência diante das minhas dificuldades.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Machado, não só orientador deste trabalho, mas um grande amigo. Agradeço-lhe pelo profundo aprendizado que me proporcionastes, tanto no meio acadêmico quanto na vida de modo geral. Pelos conselhos, pelas sábias palavras empregadas nos momentos de aflição. Pela simplicidade com que reages diante das situações adversas, pelo companheirismo, pela compreensão e acima de tudo pela amizade.

A toda equipe do Laboratório de Virologia (Sandra, Lúcio, Leonardo, Iran, Rogério, Felipe, Rosimar, Simone, Helena, Rafaela, Jamilla, Luana, Stéphanie, Bárbara, Yuri, Írlis, Isabella, Ana Cássia, Maria Alice e Carolina Miranda) que me ajudaram de forma direta ou indireta na realização desta pesquisa. E àqueles cujos nomes não estão aqui listados, deixo registrada a minha gratidão.

Às minhas amigas: Paula, Di Paula, Izete, Lucinda, Renata, Ethienne, Adriana, Carol e Bethe, que acompanharam a minha caminhada e tornaram os meus dias ainda mais felizes, mesmo quando as coisas não saíam como o esperado.

A todos os meus familiares, avós, tios, primos, padrinhos, parentes e aderentes, que torceram por mim e que foram fundamentais para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Em especial ao meu padrinho Joel (*in memoriam*), pois sei que mesmo de longe acompanhou meus passos e, sem dúvida se alegrou com a minha conquista.

Ao meu namorado, Bruno, pelo afeto e companheirismo dedicado. Pela compreensão nos momentos de *stress*. Pelas palavras de incentivo quando as PCR não funcionavam, pelas tantas vezes em que o fiz esperar na porta do laboratório porque não havia concluído as minhas atividades.

Ao meu irmão e ao meu sobrinho, tão amados, que coloriram os meus dias com suas brincadeiras, e que não me deixaram desanimar, pois quando tudo parecia perdido eles conseguiam através de um simples olhar ou um abraço me fazer sorrir e seguir em frente.

Aos meus amados pais, Antonio Carlos Monteiro e Nazaré do Socorro Monteiro, que muitas vezes abriram mão de determinadas coisas em detrimento da minha formação. Acompanharam de perto todos os momentos da minha vida, vibrando com o meu sucesso e me amparando nos momentos de tristeza. Pelo amor incondicional, pela amizade e compreensão que a mim vocês dedicaram. Vocês foram os maiores professores que a vida podia me oferecer: exemplo de determinação e dedicação. Sei que jamais poderei retribuir tudo àquilo que vocês fizeram por mim, então só me resta dizer muito obrigada! Essa vitória não é apenas minha, mas também de vocês, pois hoje estou apenas colhendo aquilo que em mim vocês plantaram...

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	12
1.1.1 Classificação e Morfologia.....	12
1.1.2 Organização Genômica do HPV	13
1.1.3 História Natural da Infecção pelo HPV	17
1.1.4 Espécies de HPV de Importância Médica.....	18
1.1.5 Replicação do HPV	19
1.1.6 Expressão Gênica Viral e Câncer Cervical.....	22
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HPV	24
1.2.1 Distribuição Geográfica do HPV.....	24
1.2.2 Infecção pelo HPV e Câncer Cervical	27
1.2.3 Transmissão e Fatores de Risco	29
1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO HPV	30
1.4 VACINAS CONTRA HPV	32
1.5 OBJETIVOS	35
1.5.1 Objetivo Geral	35
1.5.2 Objetivos Específicos	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 TIPO DE ESTUDO	36
2.2 POPULAÇÃO EXAMINADA	36

2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	37
2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	39
2.4.1 Extração do DNA.....	39
2.4.2 Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR)	41
2.4.3 Eletroforese	42
2.4.4 Sequenciamento	43
2.4.5 Precipitação do DNA Sequenciado.....	44
2.4.6 Eletroforese do DNA Sequenciado	44
2.4.7 Análise das Sequências Nucleotídicas	44
2.4.7.1 Edição e Alinhamento das Sequências	44
2.4.7.2 Análise das Sequências Nucleotídicas	45
2.5 INFERÊNCIA ESTATÍSTICA.....	45
3. RESULTADOS.....	47
4. DISCUSSÃO.....	64
5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS.....	90

RESUMO

O *Papilomavirus humano* infecta as células basais do epitélio estratificado, induzindo o desenvolvimento de lesões proliferativas benignas na pele ou mucosas. As infecções apresentam distribuição universal. Muitos estudos têm demonstrado a forte associação da infecção por espécies de alto risco com casos de câncer cervical. Sendo assim, o presente estudo visou determinar a prevalência da infecção pelo HPV em um grupo de mulheres investigadas para o câncer cervical. No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009 foram coletadas amostras cervicais de 180 mulheres atendidas no Laboratório de Citopatologia da UFPA, sendo 162 elegíveis para o estudo. De cada participante foi coletada duas amostras, uma destinada à confecção do esfregaço para posterior análise citológica, através do Método de Papanicolaou e a outra destinada à análise por biologia molecular a fim de se investigar a presença do HPV, na qual utilizou-se os iniciadores MY09 e MY11. As espécies de HPV foram identificadas através da técnica de seqüenciamento de bases nucleotídicas da ORF L1 do HPV. A análise do perfil epidemiológico do grupo estudado demonstrou que a média de idade correspondia a 37,5 anos. A maioria (49,38%) era casada, 37,65% havia iniciado a atividade sexual entre 13 e 17 anos de idade e 58,64% não usava preservativos durante as relações sexuais. A prevalência global do HPV encontrada foi de 18,52%. Treze espécies diferentes foram identificadas, sendo que a maioria (66,67%) pertencia ao grupo de baixo risco, no qual o HPV-11 foi mais freqüente. Dentre o grupo de alto risco (30%) o HPV-31 foi encontrado em quatro casos. A distribuição das espécies de HPV de acordo com o resultado citológico demonstrou que a ocorrência da infecção foi maior no grupo de mulheres cujo esfregaço era livre de alterações citológicas (43,33%). No grupo de mulheres com alterações pré-malignas só observou-se infecções por espécies de baixo risco (10%). A infecção pelo HPV mostrou associação estatisticamente significativa com a atividade sexual e com a freqüência na realização do exame preventivo. A prevalência encontrada no estudo corrobora com outros achados descritos na literatura. A predominância da infecção em mulheres com citologia normal reforça a idéia de que a infecção é, em sua maioria, assintomática e que o método de Papanicolaou é menos eficiente na detecção da infecção em relação às técnicas de biologia molecular. Entretanto, ao se tratar de detecção de doença pré-maligna ou maligna, a biologia molecular não se aplica e, portanto não deve substituir o PCCU.

ABSTRACT

The *human Papillomavirus* infects basal cells of stratified epithelium, inducing the development of benign proliferative lesions in the skin or mucous membranes. The infections have universal distribution. Many studies have demonstrated the strong association of infection by species of high-risk cervical cancer. Therefore, this study sought to determine the prevalence of HPV infection in a group of women screened for cervical cancer. From January 2008 to December 2009 were collected cervical samples from 180 women seen at the Laboratory of Cytopathology of Universidade Federal do Pará (UFPA), with 162 eligible for the study. Each participant was collected two samples, one for the manufacture of cytological smears for subsequent analysis by the Papanicolaou method and the other for analysis of molecular biology, in order to investigate the presence of HPV, using the primers MY09 and MY11. The species of HPV have been identified by PCR sequencing of nucleotide bases of the L1 ORF of HPV. The analysis of the epidemiological profile of the study group showed that the average age accounted for 37.5 years. The majority (49.38%) were married, 37.65% had initiated sexual activity between 13 and 17 years old and 58.64% did not use condoms during sex. The overall prevalence of HPV was found to be 18.52%. Thirteen different types were identified, with the majority (66.67%) was a low-risk group, in which HPV-11 was more frequent. Among the high risk group (30%) HPV-31 was found in four cases. The species distribution of HPV according to the cytology showed that the prevalence of infection was higher in the group of women whose smear was free of abnormal cytology (43.33%). In the group of women with premalignant changes only observed infections by species of low risk (10%). HPV infection was significantly associated with sexual activity and the frequency in the completion of screening. The prevalence in this study corroborates other findings in the medical literature. The prevalence of infection in women with normal cytology reinforces the idea that the infection is mostly asymptomatic and the Papanicolaou method is less efficient in detecting the infection than the techniques of molecular biology. However, when dealing with disease detection premalignant or malignant, molecular biology is not applicable and therefore should not replace the PCCU.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

1.1.1 Classificação e Morfologia

Os papilomavírus infectam muitas espécies de vertebrados, tais como felídeos, bovinos e humanos, porém são espécie-específicos (Campo *et al.*, 2002; Zheng & Baker, 2006) e todos, independente da especificidade do hospedeiro, são muito semelhantes em sua estrutura física e organização genômica (Scheurer *et al.*, 2005).

Os papilomavírus e os poliomavírus foram inicialmente agrupados em uma mesma família, a *Papovaviridae*, devido à semelhança existente entre esses vírus tais como: a ausência de envelope e o genoma constituído de dupla fita de ácido dextrorribonucléico (DNA) circular (Kenneth, 1996). Por meio de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e análise de ácido nucléico (Bernard, 2005), observou-se que esses dois grupos de vírus apresentavam diferenças no tamanho e na organização do genoma e, por esse motivo, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), atualmente, os considera pertencentes a famílias distintas: *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae*, respectivamente (ICTV, 2006).

O *Papillomavirus humano* (HPV) é um membro da família *Papillomaviridae*. Todos os membros desta família caracterizam-se por possuírem cerca de 55 nanômetros (nm) de diâmetro e não apresentarem envelope. O capsídeo possui simetria icosaédrica e envolve o genoma que consiste em dupla fita de DNA circular, com cerca de 8.000 pares de bases (pb) nucleotídicas. Mais de 100 genótipos de HPV foram isolados e identificados a partir da análise completa das sequências de DNA dos mesmos (ICTV, 2006).

Filogeneticamente, os papilomavírus são agrupados em gêneros e espécies e as lesões por eles provocadas têm diferentes características. Atualmente, os papilomavírus humano e animal compõem 16 gêneros. Cinco destes gêneros são compostos por HPV: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (ICTV, 2006). Os dois principais gêneros de HPV são os *Alphapapillomavirus* e *Betapapillomavirus* com, aproximadamente, 90% dos HPV atualmente caracterizados pertencentes a um ou outro destes grupos (Pfister, 2003).

O gênero *Alphapapillomavirus* constitui o maior grupo de HPV, no qual encontramos espécies de HPV genital-mucoso (Ramos *et al.*, 2002), as quais, assim como os *Nupapillomavirus*, podem causar lesões benignas e malignas (ICTV, 2006). Os *Betapapillomavirus* são tipicamente associados a infecções cutâneas assintomáticas em seres humanos, à exceção em indivíduos imunodeprimidos, os quais desenvolvem a epidermodisplasia verruciforme (EV), e em pacientes com câncer de pele não-melanoma (De Villiers *et al.*, 2004). Os membros do gênero *Gammapapillomavirus* e *Mupapillomavirus* provocam lesões em seu hospedeiro, as quais se distinguem, histologicamente, pela presença de corpos de inclusões intracitoplasmáticas, espécie-específicos (ICTV, 2006).

1.1.2 Organização Genômica do HPV

O genoma viral consiste de oito a nove sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF) e, compreende três regiões conhecidas como região precoce (*early region* - E) com aproximadamente, 4kb de tamanho, região tardia (*late region* - L), com 3 kb e a região controladora (*Long Control Region* - LCR), com 1 kb

(Kenneth, 1996; Zielinski *et al.*, 2003; Münger *et al.*, 2004), conforme o observado na Figura 1.

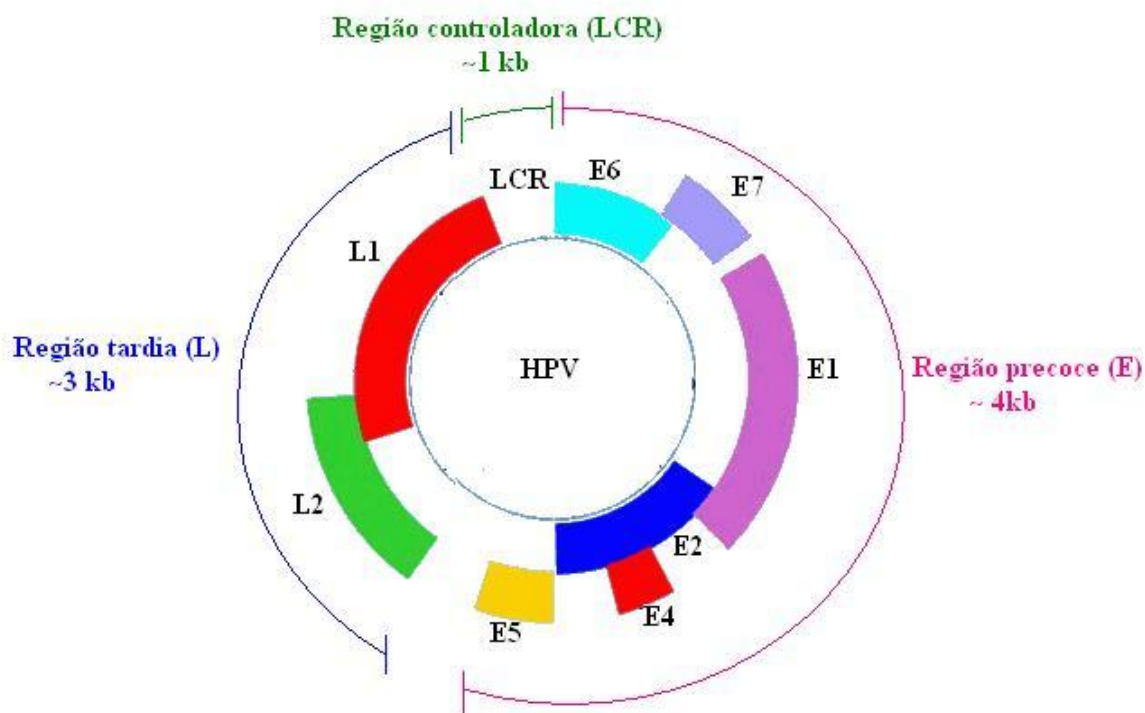


Figura 1 – Organização genômica do HPV (Adaptado de Tyring, 2000).

A região precoce ocupa mais de 50% do genoma do vírus e apresenta seis ORF (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que se traduzem individualmente em proteínas. Os genes precoces estão envolvidos na regulação da expressão gênica viral, na replicação do DNA viral e na transformação celular durante o estado epissomal (Heino *et al.*, 2000). A proteína E1 é uma fosfoproteína de 70 a 80 kilodaltons (KDa), a qual possui atividade de DNA helicase dependente de Adenosina tri-fosfato (ATP). Ela também contém domínios de ligação com DNA, domínios de ligação com a proteína E2, bem como um domínio catalisador (Hughes & Romanos, 1993).

A proteína E2 é uma fosfoproteína com três domínios funcionais. O domínio N-terminal contém, aproximadamente, 220 aminoácidos e atua como um transativador. O segundo domínio, o C-terminal, contém cerca de 90 aminoácidos e, em sua forma dimérica, pode ligar-se ao DNA do hospedeiro. O terceiro domínio é a região de dobradiça entre os outros dois domínios (Tyring, 2000). A proteína E2 liga-se ao LCR e reprime a transcrição de E6 e E7 (McBride *et al.*, 1991). A proteína codificada por E1 facilita a ligação da proteína E2 na região promotora. No caso das células malignas, a razão E1/E2 muda quando o vírus integra-se no cromossomo da célula hospedeira e a repressão da transcrição de E6 e E7 é perdida (Shirasawa *et al.*, 1987).

Alguns estudos utilizando a deleção ou mutagênese sítio-dirigida tem permitido a atribuição de funções específicas para as diversas ORF viral. Em síntese, proteínas codificadas pelas ORF E5, E6 e E7 são responsáveis pela mudança dos promotores virais. A função da proteína E4 ainda está para ser determinada, mas ela é, predominantemente, o produto das fases precoce e fases tardia da infecção viral e pode modular mudanças estruturais no citoplasma das células infectadas (Peh *et al.*, 2002, Stoler, 2003), as quais incluem perturbações na rede de citoqueratina, resultando na coilocitose (Roberts *et al.*, 1994; Doorbar *et al.*, 2000). A proteína E5 é uma proteína hidrofóbica associada à membrana, a qual esta associada à ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico, resultando na estimulação do crescimento celular (Howley, 2006). As prováveis funções das ORF estão ilustradas no Quadro 1.

A região tardia do genoma dos papilomavírus, corresponde a 40% do genoma do vírus, situa-se após a região precoce e apresenta as ORF L1 e L2, importantes na tradução das grandes e pequenas proteínas do capsídeo, respectivamente (Danos *et al.*, 1982).

A região LCR contém promotores não-codificadores de proteínas, porém possui elementos envolvidos na replicação do DNA, bem como vários fatores de transcrição ligados a sítios, que são importantes na regulação da RNA-polimerase II celular iniciado a partir da transcrição de promotores virais precoces e promotores tardios (Zheng & Baker, 2006). O promotor E6, assim como um ou mais promotores específicos no LCR é comum entre as espécies de HPV. A multiplicidade dos promotores é o diferencial entre as espécies e os diferentes *splicing* permitem a origem de muitos RNA mensageiros (mRNA) diferentes (Turek, 1994).

Quadro 1 – Proteínas codificadas pelas ORF dos papilomavírus e suas funções

Proteínas	Funções
E1	Replicação do DNA, atividade DNA helicase dependente de ATP
E2	Regulação da transcrição e auxílio na replicação do DNA
E3	Não está elucidado
E4	Proteína citoplasmática abundante em verrugas Destruição dos filamentos de queratina
E5	Transformação. Impede a regulação negativa dos receptores ativados
E6*	Transformação. Degradação da p53 e ativação transcricional da telomerase celular
E7*	Transformação. Ligação e inativação da pRb. Interfere na duplicação do centrômero, resultando em aneuploidia.
E8	Não está elucidado
L1	Síntese das grandes proteínas do capsídeo
L2	Síntese das pequenas proteínas do capsídeo

* Proteínas superexpressas em espécies de HPV associados a câncer (Fonte: Howley, 2006).

1.1.3 História Natural da Infecção pelo HPV

A aquisição do HPV resulta em uma infecção de duração variável, que pode ou não estar associada ao desenvolvimento de lesões clinicamente aparentes (Scott *et al.*, 2001). O vírus penetra no epitélio através de microlesões e infecta a superfície epitelial, podendo induzir o desenvolvimento de lesões benignas proliferativas ou de verrugas na pele, nas mucosas e no trato genital (Finnem *et al.*, 2003) e, por esse motivo, pode ser dividido em tipo cutâneo ou mucoso (Sanclement & Gill, 2002).

O tipo cutâneo é encontrado na população em geral e causam verrugas comuns (Rácz, 2004). Outros tipos cutâneos são encontrados em indivíduos que estão imunodeprimidos (Zielinski *et al.*, 2003), enquanto que o tipo mucoso infecta as células basais do epitélio estratificado escamoso e as células metaplasicas da junção escamo-colunar do colo do útero. O tipo mucoso é ainda classificado em alto risco e baixo risco, de acordo com a sua associação com câncer cervical (Scheurer *et al.*, 2005). Além disso, os HPV podem infectar o epitélio glandular da endocervix, resultando em neoplasias endócrinas, como o adenocarcinoma *in situ* ou adenocarcinoma invasivo (Longworth *et al.*, 2004).

O período de incubação da infecção viral varia de algumas semanas para, possivelmente, até mais de 18 meses, no entanto, na maioria dos indivíduos infectados o vírus raramente produz lesões clinicamente aparente (Sonnex, 1998) podendo a infecção pelo HPV ser assintomática, subclínica ou clínica. Em infecções assintomáticas não ocorre alterações citológicas, embora o DNA viral possa ser detectado por técnicas de biologia molecular (Burd, 2003). A infecção subclínica caracteriza-se por uma infecção sintomática, porém, as lesões só podem ser encontradas com a utilização de um colposcópico ou por meio de exame microscópico, mas não com exame visual. A

infecção clínica caracteriza-se pela presença de lesões que são visíveis e o paciente pode ter sintomas (Tyring, 2000).

1.1.4 Espécies de HPV de importância médica

Ainda não estão disponíveis reagentes sorológicos para distinguir as diferentes espécies de HPV, portanto, a distinção entre elas é feita por meio da análise das sequências do DNA viral (Howley, 2006). A ORF L1 é a região mais conservada do genoma do HPV e tem sido utilizada na identificação de novas espécies de HPV há mais de quinze anos (De Viliers *et al.*, 2004). Uma nova espécie de HPV isolado só é reconhecida se as divergências entre a sequência de DNA da ORF L1 do vírus for maior que 10% quando comparado às sequências das espécies de HPV já descritas. Diferenças entre 2 e 10% define uma subespécie e, diferenças abaixo de 2%, define uma variante (ICTV, 2006).

Os HPV do tipo genital-mucoso são classificados, de acordo com o seu potencial de induzir o desenvolvimento de lesões malignas, em: espécies de alto risco, espécies prováveis de alto risco ou risco intermediário e espécies de baixo risco (Muñoz *et al.*, 2003), conforme demonstrado no Quadro 2.

As espécies de baixo risco mais comuns são HPV-6 e o HPV-11, detectados com maior frequência em verruga genital benigna (Dunne & Markowitz, 2006; Garnett & Duerksen- Hughes, 2006). Entre as espécies de alto risco, os HPV-16, HPV-18, HPV-31 e HPV-45 são encontrados com frequência em carcinoma de células escamosas cervicais, respondendo por quase 80% dos casos (Bosch *et al.*, 2002), sendo que o HPV-16 e o HPV-18 são responsáveis por 50% e 20% dos casos em todo o mundo, respectivamente (Clifford *et al.*, 2003; Dueñas-González *et al.*, 2005). O HPV-

18 é a espécie mais prevalente em adenocarcinoma cervical (55%), seguido pelo HPV-16 (32%) e HPV-45 (10%) (Tyring, 2000; Zielinski *et al.*, 2003; De Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005; Zheng & Baker, 2006).

Quadro 2 - Classificação dos HPV de acordo com o seu potencial oncogênico.

Potencial Oncogênico	Espécies de HPV
Alto-Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Risco-Intermediário	26, 53, 66
Baixo-Risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

A infecção com espécies de alto risco pode causar doenças de baixo-grau (lesões escamosas intraepiteliais de baixo-grau, LSIL), a qual se manifesta pela inibição da diferenciação normal da terceira camada do epitélio (Longworth & Laminis, 2004). A lesão pode permanecer em baixo-grau, regredir ou progredir para a displasia severa ou lesão escamosa intraepiteliais de alto-grau (HSIL). Este último estágio pode persistir ou pode iniciar a invasão da membrana basal adjacente levando a metástase (McMurray *et al.*, 2001).

1.1.5 Replicação do HPV

O alvo da infecção pelo HPV são as células que compõem o epitélio estratificado (Kenneth, 1996; Doorbar, 2005). Esse tecido é composto por camadas finas de células não-divididas em vários estágios de diferenciação terminal, com a camada

superior sendo a mais diferenciada. Apenas células da camada mais inferior deste tecido (as células basais) se proliferam (Doorbar, 2005). Apesar do ciclo replicativo do HPV começar com a infecção de uma célula basal, ele só se conclui quando as células infectadas chegam às camadas superiores do epitélio (Hoffman *et al.*, 2006).

Para iniciar uma infecção, os papilomavírus devem ser capazes de se ligar a receptores presentes na superfície de sua célula-alvo, e, depois, ser transportado através da membrana para o citoplasma (Longworth & Laminis, 2004). Acredita-se que o receptor para a entrada do vírus seja a integrina- $\alpha 6$, situada na camada basal (Evander *et al.*, 1997; McMillian *et al.*, 1999). O DNA viral será transportado para o núcleo a fim de iniciar a transcrição gênica e a replicação do DNA (Zhou *et al.*, 1995).

O ciclo replicativo do papilomavírus depende do programa de diferenciação do epitélio escamoso e envolve vários eventos, tais como a amplificação do genoma, a expressão de genes tardios e a montagem da partícula viral (Kenneth, 1996). A análise do DNA dos papilomavírus, em tecidos de verrugas, sugere que a replicação do DNA viral pode ser dividida em três fases: fase inicial da infecção, fase proliferativa das células basais e fase de replicação vegetativa (Del Vecchio *et al.*, 1992).

Na fase inicial da infecção, o genoma viral se estabelece como DNA episomal (cromossomo extra) tornando-se estável (Doorbar, 2005). O padrão de expressão dos genes virais nestas células não está bem definido, porém, sugere-se que, geralmente, as proteínas virais E1 e E2 são expressas para manter o DNA viral como um epissoma (Wilson *et al.*, 2002), bem como para facilitar a separação correta do genoma durante a divisão celular (You *et al.*, 2004). Um número baixo de cópias (50 a 100

cópias) do epissoma é replicado em conjunto com os cromossomos das células basais do epitélio escamoso (Del Vecchio *et al.*, 1992).

Na fase de proliferação das células do epitélio inferior, as células da camada basal se dividem e algumas células-filhas permanecem na camada inferior, na qual o número de cópias do genoma viral mantém-se relativamente estável através de vários ciclos de divisão celular. Outras células-filhas migram para a parte superior do epitélio, onde iniciam a diferenciação terminal e disseminam o vírus a todas as outras “células-irmãs” (Figura 2) (Watt, 1998; Scheurer *et al.*, 2005). Células diferenciadas contêm pouca ou nenhuma maquinaria replicativa, portanto o vírus será incapaz de se propagar se as células estiverem em diferenciação terminal (McMurray *et al.*, 2001). Durante a infecção pelo papilomavírus ocorre a expressão da proteína E7 (e, provavelmente, E6) por estas células, o que estaciona e bloqueia a progressão do ciclo celular, dessa forma retardando a diferenciação terminal normal (Sherman *et al.*, 1997). A presença do vírus provoca anormalidades morfológicas nas células infectadas, tais como papilomatose, paraceratose e coilocitose (Lowy & Schiller, 2006).

Como os queratinócitos infectados sofrem diferenciação terminal, o DNA viral sofre replicação vegetativa, na qual é amplificado milhares de cópias por célula infectada. Os genes tardios que codificam as proteínas do capsídeo viral são expressos subsequentemente e as partículas infecciosas são formadas (Kenneth, 1996). Nos HPV-2, HPV-11 e HPV-16 este processo ocorre na metade da camada basal superior, devido ao aumento da atividade do promotor tardio, o qual está localizado na ORF E7 e a sua regulação conduz ao aumento da expressão de proteínas envolvidas na replicação do DNA viral (E1, E2, E4 e E5) sem afetar diretamente a expressão de E6 e E7, necessárias para a entrada da célula na fase S (Peh *et al.*, 2002). A amplificação do genoma viral

requer a expressão de todos os produtos dos genes precoces, incluindo E4 e E5, cujos papéis na replicação ainda não são totalmente conhecidos (Fehrmann *et al.*, 2003).

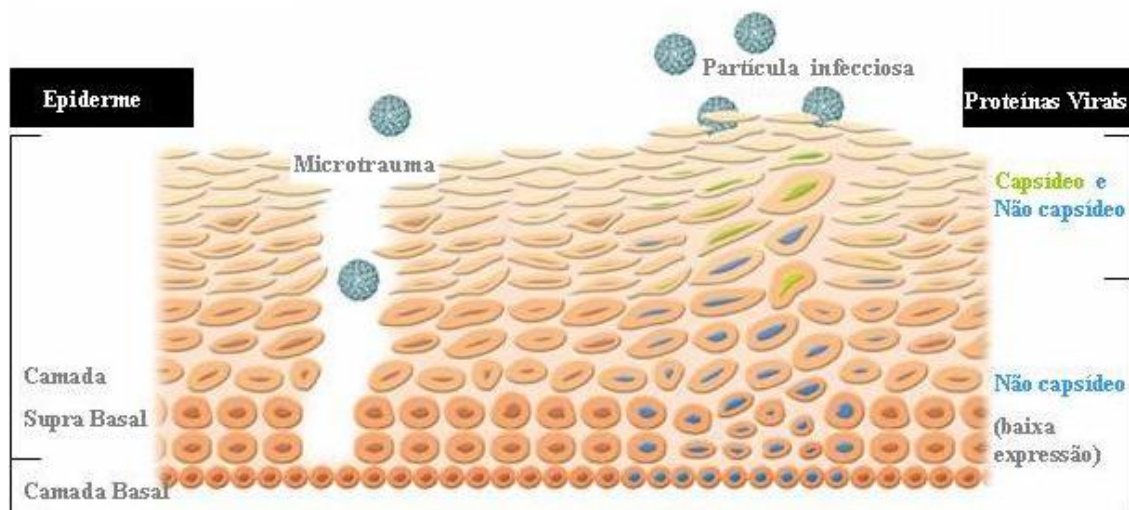


Figura 2 - Ciclo replicativo do HPV no epitélio (Adaptado de Lowy & Schiller, 2006).

1.1.6 Expressão Gênica Viral e Câncer Cervical

Os HPV estão envolvidos no desenvolvimento de várias lesões epiteliais malignas diferentes (Duensing *et al.*, 2000). O estado físico do DNA viral em lesões benignas e malignas é diferente. Na primeira, o DNA permanece circular em uma forma episomal, na qual a E2 regula a expressão das proteínas E6 e E7. Nas lesões malignas, o DNA se integra a sítios cromossômicos da célula hospedeira (Brenna & Syrjänen, 2003). A integração do genoma viral ocorre aleatoriamente no cromossomo celular sendo que neste evento as ORF E6 e E7 são preservadas e a ORF E2 é perdida, desregulando a expressão de E6 e E7 (Bechtold *et al.*, 2002), o que sugere que a

expressão de E6 e E7 é importante para o fenótipo de invasão celular (Van Tine *et al.*, 2004, Pett *et al.*, 2006; Narisawa-Saito & Kyiono, 2007).

Em espécies de HPV de alto risco, as proteínas E6 e E7 podem se ligar a proteínas reguladoras do ciclo celular (produtos de genes supressores de tumor), estimulando a progressão deste (Münger *et al.*, 2001). A E6, por exemplo, liga-se com alta afinidade à proteína p53, degradando-a, enquanto que a E7 se associa e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb), o que ocasiona a instabilidade genética (Herrington, 1995; Brenna & Syrjänen, 2003; Scheurer *et al.*, 2005) e, subsequentemente, a imortalização e transformação da célula hospedeira (Howley, 2006). Além disso, E6 interage com uma série de proteínas diferentes que medeiam o percurso da apoptose e a estabilidade cromossômica regulam a transcrição, organização epitelial, polaridade celular, proliferação e controle da célula infectada (Garnett & Duerksen-Hughes, 2006). Interações de E6 com estas diferentes proteínas contribuem para a eficácia global da E6 na promoção da oncogenicidade do HPV (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008).

No decurso da infecção pelo HPV-16 a associação da E7 com membros da família da pRb está bem caracterizada (Werness *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 2004). A pRb é um regulador negativo do ciclo celular que normalmente se associa a fatores de transcrição da família E2F, fazendo com que a célula entre na fase S (Figura 3) (Brenna & Syrjänen, 2003). A ligação da proteína E7 com a pRb desloca o E2F, independente da presença de fatores de crescimento externos, e conduz à expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA celular (Doorbar, 2006).

Um estudo realizado por Duensing *et al.* (2000) demonstrou que lesões genitais malignas, pré-invasiva ou invasiva, associadas à infecção pelo HPV-16 apresentam anormalidades nos centrômeros, as quais contribuem para a ocorrência de

mitoses anômalas, bem como para a instabilidade genética, resultando em aneuploidia. Em contraste, as células expressando genes E6 ou E7 de HPV-6 de baixo risco não mostraram tais anormalidades.

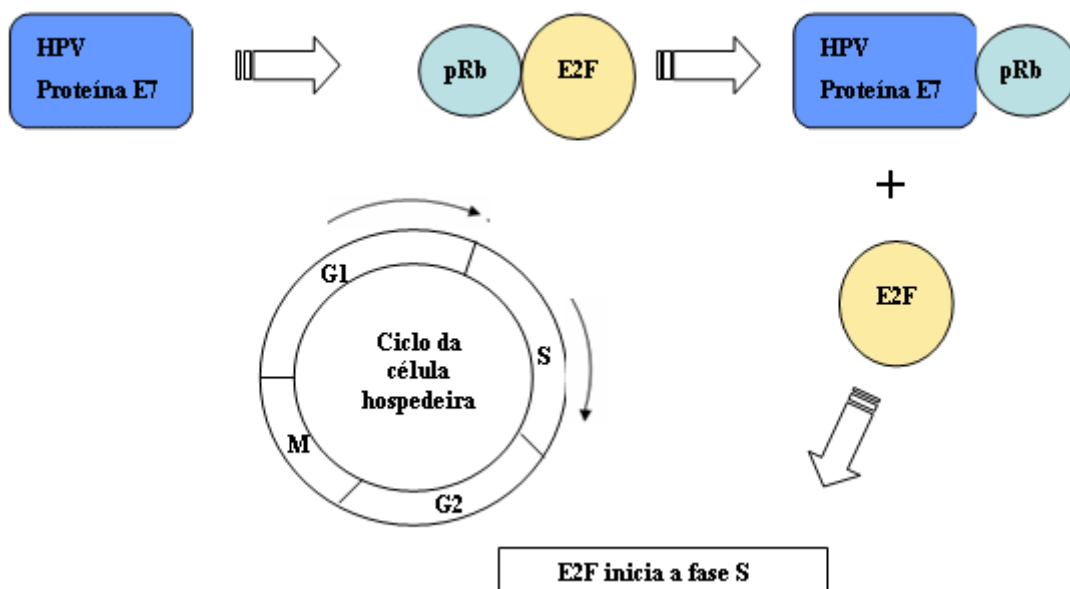


Figura 3 - Associação da proteína E7 do HPV-16 com a proteína pRb da célula hospedeira.

1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HPV

1.2.1 Distribuição Geográfica do HPV

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que, pelo menos, metade de todas as pessoas sexualmente ativas no mundo será infectada pelo HPV em algum momento das suas vidas, enquanto que, no mínimo, 80% das mulheres

adquirem uma infecção pelo HPV até os 50 anos de idade (CDC, 2004). Adolescentes que são sexualmente ativas têm as mais altas taxas de prevalência e as taxas de infecção pelo HPV incidente, com mais de 50 % tendo infecções dentro de 2 a 3 anos após o início da atividade sexual (Moscicki, 2007).

A prevalência da infecção pelo HPV pode variar muito de acordo com a população estudada. Mulheres portadoras do *Vírus da imunodeficiência humana 1* (HIV-1) têm uma elevada prevalência da infecção pelo HPV e, geralmente, apresentam infecções com múltiplos genótipos (Minkoff *et al.*, 1998). Em um estudo conduzido em Zambia, na África, a prevalência entre participantes portadoras do HIV foi de 80%, enquanto que em pacientes soronegativos para o HIV-1 a prevalência foi de 55%. Infecções com múltiplos genótipos foram identificadas em 11,4%, sendo que 7,1% foi observado em pacientes portadoras do HIV (Ng'andwe *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Smits *et al.* (2005), utilizando amostras de urina de homens infectados com HIV, em Amsterdam, Holanda, verificou uma prevalência de 39,4%, sendo que 41% possuíam infecção por múltiplos genótipos, onde o HPV-52 foi o mais prevalente. Nos homens não-infectados a prevalência foi 9,6% e, destes três participantes possuíam genótipos múltiplos.

Na Mongólia, Garland *et al.*, (2001) examinaram um grupo de mulheres atendidas em uma clínica de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e constataram que 36% destas mulheres apresentavam infecção pelo HPV, sendo que destas 44% apresentavam infecção com genótipos oncogênicos.

Um estudo envolvendo 272 mulheres atendidas no Hospital Ramon e Cajal, em Madri, detectou uma prevalência da infecção pelo HPV equivalente a 77,94%

da população estudada, na qual as espécies HPV-16 e/ou HPV-18 foram detectados em 33,02% dos casos (Chacón *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos, Peyton *et al.* (2001) encontraram uma prevalência de 39,2% do HPV em mulheres atendidas em uma clínica ginecológica, na qual a prevalência das espécies de alto risco, baixo risco e espécies não caracterizadas foi 26,7%, 14,7% e 13%, respectivamente.

Em Varsóvia, na Polônia, foi identificada uma prevalência de 16,6% na população feminina em geral. Dentre as mulheres que não apresentavam anormalidades citológicas, a prevalência foi de 14,4%, já entre as mulheres com alterações citológicas houve uma prevalência de 65,7%, onde o HPV-16 foi o mais prevalente (25,7%) (Bardin *et al.*, 2007). Na Itália, um estudo conduzido entre a população de mulheres assintomáticas identificou uma prevalência de 15,9%, onde o HPV-16 foi o mais prevalente (Centurioni *et al.*, 2005).

Na Ásia, Bao *et al.* (2007) observaram uma prevalência global de 85,9%, dentre as mulheres que apresentavam lesão do tipo HSIL, LSIL ou citologia normal a prevalência foi de 81,0%, 72,9% e 14,4%, respectivamente. Em mulheres profissionais do sexo no Japão, Ishi *et al.* (2000) observaram uma prevalência da infecção pelo HPV correspondente a 62,1% da população examinada.

No Brasil, entre os anos de 1997 e 1998, 19,1% das mulheres encarceradas na Penitenciária Feminina de São Paulo estavam infectadas pelo HPV (Lopes *et al.*, 2001). Nesse mesmo Estado, Levi *et al.* (2002) verificaram a prevalência do HPV em mulheres portadoras do HIV e constataram a infecção em 98% da população estudada, na qual o HPV-6 foi o genótipo mais prevalente, sendo observado

em 39,2% dos pacientes, seguido dos HPV-51 (31,9%), 11 (26,0%), 18 (24,0%), e 16 (22,5%).

A análise de amostras cervicais de mulheres rastreadas para o câncer de cervical na cidade de São Paulo (Rama *et al.*, 2008) demonstrou uma prevalência de 17,8% da infecção genital pelas espécies de HPV de alto risco, com uma predominância dos casos em mulheres com idade abaixo de 25 anos e um novo aumento entre as mulheres com idade superior a 55 anos. Na cidade do Rio de Janeiro, Pereira *et al.* (2007) observaram uma prevalência de 75,6% entre as mulheres atendidas pelo Serviço de Patologia Cervical do Hospital Universitário Antonio Pedro. Na Cidade de Porto Alegre, Igansi (2005) encontrou uma prevalência do HPV correspondente a 28,4% da população investigada. No nordeste brasileiro Soares *et al.* (2003) observou uma prevalência de 26% entre as mulheres com idade reprodutiva.

A infecção pelo HPV genital pode não ser clinicamente aparente em homens. Della Torre *et al.* (1992) analisaram 64 amostras de conteúdo uretral de homens que tinham parceiras portadores do HIV, onde o DNA do HPV foi detectado em 14 casos (21%). Um estudo semelhante realizado na cidade de São Paulo identificou uma prevalência de 25,9% dentre as amostras analisadas (Giraldo *et al.*, 2008).

1.2.2 Infecção pelo HPV e Câncer Cervical

O câncer cervical é uma das principais causas de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo. A infecção do epitélio por algumas espécies de HPV é o principal fator responsável por esse tipo de câncer (Bechtold *et al.*, 2002).

Muitos estudos epidemiológicos têm, consistentemente, demonstrado que mais de 90% dos cânceres cervicais pode ser atribuído a espécies específicas de HPV

(Del Mistro, 2006; Chacón *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2008). Um estudo conduzido entre mulheres com câncer cervical invasivo na Itália, demonstrou que 91,7% estavam infectadas pelo HPV, onde o HPV-16 e o HPV-18 estavam presentes em 75,0% dos casos (Del Mistro *et al.*, 2006). No Norte da Tailândia, Siriaunkgul *et al.* (2008) investigaram a presença de HPV em amostras de biópsias de pacientes com carcinoma epidermóide invasivo e constataram que 96% das amostras apresentavam infecção pelo vírus, na qual 78,1% possuíam infecção com único genótipo, sendo o HPV-18 o mais comum, representando 64,4% dos casos. A investigação da distribuição dos genótipos em pacientes com câncer cervical em Zhejiang, Província da China, demonstrou que o HPV estava presente em 95% dos casos de câncer cervical (Hong *et al.*, 2007).

De acordo com dados fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), no período de 2008 a 2009, ocorrerão 18.680 casos de câncer do colo do útero no Brasil, com um risco estimado de 19 casos a cada 100 mil mulheres, constituindo o tipo de câncer mais freqüente na Região Norte. Nesse período, cerca de 790 casos novos de câncer do colo do útero serão registrados no Estado do Pará, sendo que mais da metade (400 casos) ocorrerão em Belém (INCA, 2008; Figura 4). Esse fato coloca a capital do Estado como uma área de elevada prevalência para o câncer cervical. Muitos estudos têm demonstrado a existência de uma associação significativa entre a infecção pelos HPV de alto risco e o desenvolvimento da neoplasia (Del Mistro, 2006; Chacón *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007). Sendo assim, a análise da prevalência da infecção pelo HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical na cidade de Belém, Pará, poderia contribuir, mesmo que indiretamente, para a identificação das espécies de HPV com forte potencial oncogênico e dessa forma evitar a evolução das lesões para a malignidade.

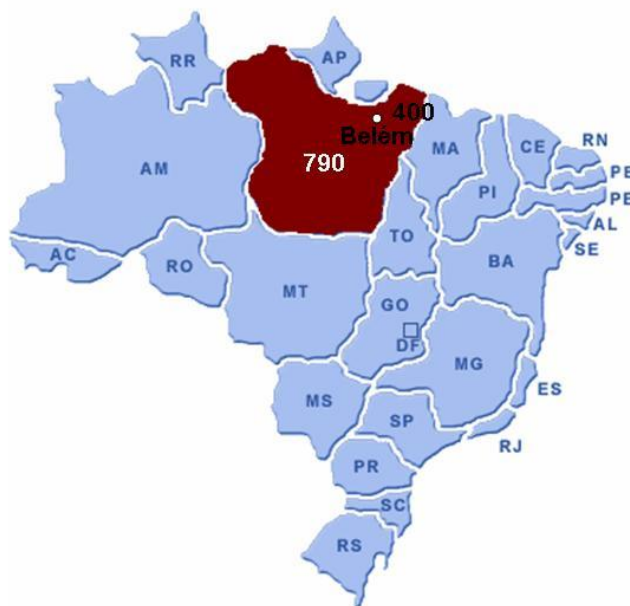


Figura 4 – Estimativa dos casos novos de câncer no Brasil e no estado do Pará, no período de 2008 a 2009 (Adaptado, INCA 2008).

1.2.3 Transmissão e Fatores de Risco

A transmissão do HPV pode ocorrer por meio do contato sexual, não-sexual (Ault, 2001) e materno fetal (Ruffin IV *et al.*, 2006). Acredita-se que a transmissão do HPV seja, predominantemente, por via sexual já que o HPV genital-mucoso está ausente na maioria das mulheres que não possui vida sexual ativa (Gall, 2001; Shimada *et al.*, 2007). O HPV é muito resistente ao calor (Roden *et al.*, 1997), e a transmissão pela via não-sexual (por fômites) também pode ocorrer, como em caso de exposição prolongada a peças íntimas compartilhadas e contaminadas (Burd, 2003). O risco de transmissão aumenta quando as verrugas genitais estão presentes uma vez que elas refletem a infecção produtiva do HPV (Gall, 2001).

Os principais fatores de risco para a aquisição da infecção pelo HPV genital-mucoso envolvem o comportamento sexual, o que sugere que a atividade sexual constitui o principal fator de risco para a infecção pelo HPV (Koutsky, 1997). Sellors *et al.* (2003) em um estudo realizado em Ontário, Canadá, identificaram a idade (faixa etária entre 15 e 24 anos), o número de parceiros sexuais e a história de DST como fatores de risco para a aquisição da infecção pelo HPV em mulheres e, nos homens, o não-uso de preservativo (Kataja *et al.*, 1993). Além disso, em um estudo envolvendo mulheres brasileiras atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) das cidades de São Paulo, Campinas e Porto Alegre, Roteli-Martins *et al.* (2007) encontraram uma associação significativa entre a idade precoce da primeira relação sexual e a aquisição da infecção pelo vírus.

Embora eficaz em prevenir a disseminação de muitos agentes sexualmente transmissíveis, o uso de preservativo pode não proteger adequadamente os indivíduos em exposição ao HPV, tendo em vista que o HPV pode ser transmitido pelo contato labial, escrotal, anal ou pelo contato com tecidos infectados que não são protegidos pelo preservativo (Burd, 2003). É difícil avaliar com precisão o papel dos preservativos na prevenção da infecção pelo HPV e o desenvolvimento de complicações clínicas de infecções.

1.3 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO HPV

A citologia é a ferramenta de escolha para o rastreamento da infecção pelo HPV, bem como para a detecção precoce de casos de cânceres cervicais (Jung *et al.*, 2004). Apesar de seu sucesso, a citologia tem importantes limitações, na qual os resultados falso-negativos são os mais importantes, provavelmente devido a erros de

interpretação (Franco *et al.*, 2001; Bulk *et al.*, 2008). Quase metade dos espécimes examinados tem resultados falso-negativos, uma vez que a citologia serve como um teste de triagem, na qual se detecta alterações sugestivas da infecção pelo HPV, tais como a coilocitose, caracterizada por um halo prerinuclear e a discariose – presença de células alargadas, com núcleo irregular (Munro, 1992).

A associação existente entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical é a principal razão para se fazer a análise citológica pelo Método de Papanicolaou e por isso essa técnica foi instituída pelo Governo Federal Brasileiro. Esse método de rastreio reduziu em 50% a mortalidade por câncer cervical nos últimos 30 anos (Jung *et al.*, 2004). O esfregaço em citologia de base líquida tem uma sensibilidade estimada entre 85% e 95% para detecção de alterações citológicas sugestivas da infecção pelo HPV (Kaplan-Myrth & Dollin, 2007).

Uma nova terminologia para relatar os resultados da citologia cervical é o Sistema de Bethesda. Esse sistema foi desenvolvido para refletir uma compreensão avançada da neoplasia cervical e introduzir um diagnóstico histológico descritivo e uma terminologia uniforme. O sistema classifica as anormalidades das células escamosas em quatro categorias: (i) célula atípica de significado indeterminado – ASCUS; (ii) lesão intraepitelial escamosa de baixo grau – LSIL; (iii) lesão intraepitelial de alto grau – HSIL e (iv) carcinoma de células escamosas (Burd *et al.*, 2003).

Em mulheres com suspeitas de infecção pelo HPV, faz-se necessário o emprego de métodos alternativos de detecção do vírus e que sejam altamente sensíveis. A identificação do DNA viral por métodos de biologia molecular, em especial a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) e Captura Híbrida, tem sido relatada por

vários pesquisadores, sendo a primeira referida como a mais sensível no que diz respeito à identificação do DNA viral (Finan *et al.*, 2001).

A Captura Híbrida é uma técnica capaz de detectar o DNA do vírus, permitindo a identificação dos tipos virais em alto e baixo risco. Indiretamente essa técnica prediz o risco de evolução das lesões para o câncer cervical (Novaes *et al.*, 2006). No Brasil, este exame não é rotineiro, sendo solicitado, geralmente, por médicos de clínicas ginecológicas privadas uma vez que esse exame é bem mais caro que os exames citológicos convencionais.

Os tratamentos das lesões são frequentemente classificados em cirúrgicos ou não cirúrgicos. Tratamentos cirúrgicos incluem eletrocirurgia, excisão cirúrgica, crioterapia e cirurgia a laser. O tratamento não cirúrgico inclui o uso de podofilina, interferon e ácido bi ou tri-cloro-acético (Burd, 2003).

1.4 VACINAS CONTRA HPV

A abordagem primária na prevenção da infecção pelo HPV envolve a redução dos riscos para a aquisição da mesma e o desenvolvimento de vacinas. O reconhecimento da associação entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical, na década de 1990, estimulou estudos empenhados no desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes contra o vírus (Mansi, 2007).

Em 1991, Zhou *et al.* mostraram que a proteína recombinante L1 do HPV, expressa em sistemas de modelo animal, tem significada importância na montagem das partículas virais. Estas, quando administradas como um imunógeno, induzem altos títulos de anticorpos neutralizantes no plasma (Christensen *et al.* 1994; Yuan *et al.*, 2001; Culp *et al.*, 2007). Por isso, as estratégias atuais para o

desenvolvimento seguro e eficaz de vacinas preventivas são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes contra as grandes e pequenas proteínas do capsídeo, L1 e L2 do HPV (Kim *et al.*, 2008).

Para ser amplamente aprovada, a vacina profilática precisa conferir alto nível de proteção durante vários anos, bem como oferecer alto nível de segurança já que será administrada em indivíduos saudáveis. Duas empresas farmacêuticas, a Merck e a GlaxoSmithkline, relataram, recentemente, um elevado grau de proteção conferida pelas vacinas profiláticas por eles desenvolvidas (Garland *et al.*, 2007; The Future II Study Group, 2007). Ambas as vacinas são fabricadas usando a tecnologia de DNA recombinante, resultando em partículas virais não infecciosas contendo antígenos da proteína L1 do capsídeo do HPV (Lowy e Schiller, 2006).

Em 2006, a primeira vacina contra a infecção pelo HPV, Gardasil, foi aprovada para uso no Canadá (Dawar *et al.*, 2007). Trata-se de uma vacina quadrivalente que oferece proteção contra as espécies de HPV-6 e 11, responsáveis por 90% das verrugas genitais, e de HPV 16 e 18, os quais estão associados com 70% de cânceres cervicais (Merck Frosst, 2006).

Villa *et al.* (2006) avaliaram a eficácia da vacina quadrivalente em 552 mulheres com idade entre 16 e 23 anos e verificaram que, após cinco anos, houve uma redução de 96% na incidência da infecção persistente ou de doença nas pacientes vacinadas, sugerindo que a vacina, administrada em três doses, confere proteção durante cinco anos. A vacinação em três doses também demonstrou reduzir, significativamente, a incidência de doenças anogenitais associadas ao HPV em mulheres jovens (Garland *et al.*, 2007; Govan, 2008).

A vacina Cervarix que ainda está sendo avaliada pelo Ministério da Saúde do Canadá, é bivalente e protege contra as espécies de HPV-16 e 18. A vacina é formulada com um novo adjuvante (ASO4) que contém o monofosforil lipídico A, o qual é derivado da parede celular bacteriana (Harper *et al.*, 2004).

Essas vacinas não são eficazes na eliminação de infecção pré-existente ou de doenças neoplásicas relacionadas ao HPV e, por isso, alguns estudos estão voltados para o desenvolvimento de vacinas que utilizem partículas das proteínas E6 e E7 do HPV, envolvidas no processo neoplásico, tal como o de Kim *et al.* (2008).

Foram construídas vacinas terapêuticas de DNA utilizando os genes que codificam as proteínas E6 e E7 do HPV-16, as quais funcionariam como imunógeno. A administração das vacinas, em três doses, em camundongos induziu uma redução no volume do tumor e aumento da sobrevivência dos animais afetados, bem como o aumento na resposta imunológica mediada por Linfócitos T Citotóxicos (Brinkman *et al.*, 2007), resultando em um efeito terapêutico significativo contra a expressão de E6/E7 em células tumorais (Kim *et al.*, 2008).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Descrever a ocorrência da infecção pelo *Papillomavirus humano* em mulheres submetidas ao Exame Preventivo de Câncer de Colo Uterino atendidas no Laboratório de Citopatologia, da Universidade Federal do Pará (UFPA).

1.5.2 Objetivos Específicos

- Descrever a ocorrência da infecção pelas espécies de HPV de alto risco;
- Comparar os resultados obtidos por meio da análise citológica, em relação a suspeita da infecção pelo HPV, com os resultados obtidos por meio de técnicas de biologia molecular;
- Descrever os fatores associados à infecção pelo HPV na população examinada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo de prevalência de base populacional do tipo observacional transversal. Neste tipo de estudo, todas as informações epidemiológicas foram obtidas em um único momento.

2.2 POPULAÇÃO EXAMINADA

A população estudada foi composta de mulheres que buscaram, espontaneamente, o serviço de “Prevenção do câncer do colo do útero” (PCCU) oferecido pelo Laboratório de Citopatologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFPA.

Considerou-se como critérios de inclusão: (i) ter ou já ter tido vida sexualmente ativa; (ii) ter idade igual ou superior a 18 anos; (iii) obtenção de lâminas com esfregaço satisfatório e/ou adequado para análise citológica e; (iv) ser residente na cidade de Belém, Pará.

Todas as participantes foram orientadas a cerca dos objetivos do trabalho e, aquelas que concordaram em participar do mesmo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e em seguida responderam a um questionário epidemiológico (Anexo 2).

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) em obediência às resoluções nº 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e normas regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos.

2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008 foram coletadas 180 amostras cervicais de todas as mulheres que buscaram atendimento no Laboratório de Citopatologia da UFPA. A princípio foram coletadas duas amostras de cada participante: a primeira destinada à confecção da lâmina para a análise citológica e a outra conduzida à análise por biologia molecular.

Para a realização da coleta, a participante foi colocada em posição ginecológica, o mais confortável possível. O espécuro vaginal introduzido teve o tamanho de acordo com as características perineais e vaginais da mulher a ser examinada (pequeno, médio ou grande). O espécuro foi introduzido suavemente, porém, de modo a expor completamente o colo uterino.

Primeiramente, observou-se as características do colo uterino. Para a análise citopatológica, procedeu-se com a coleta de material de duas regiões cérvico-uterina, a região externa (ectocérvice) e a região interna (endocérvice), as quais são distribuídas em uma única lâmina.

A coleta do material da ectocérvice foi feita com o auxílio de uma espátula de madeira do tipo Espátula de Ayres, a qual possui uma extremidade arredondada e outra extremidade com uma reentrância que permite uma boa relação anatômica com a superfície do colo uterino. A colheita se deu através de um movimento giratório de 360° em torno do orifício cervical. Em seguida, o material coletado foi distendido de maneira uniforme, no sentido transversal, na metade superior da lâmina.

O material da endocérvice foi colhido por meio de uma escovinha endocervical do tipo Campo da Paz, a qual foi introduzida no canal cervical e, novamente através de um movimento giratório de 360°, obteve-se o material desejado.

Este material foi distendido de modo longitudinal na porção inferior da lâmina. Na Figura 5 estão ilustradas a espátula e a escovinha endocervical utilizadas na coleta do material, bem como a disposição em lâmina do material coletado.

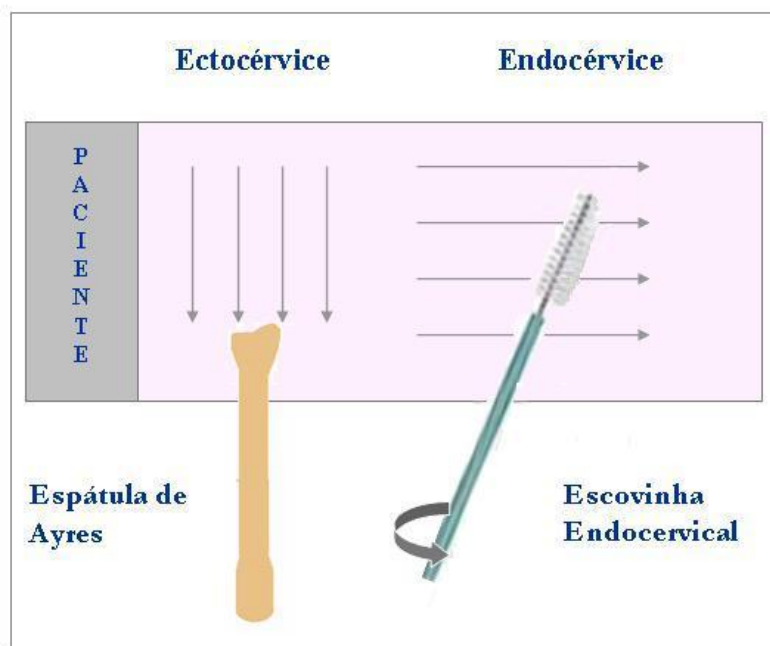


Figura 5 – Distribuição na lâmina dos materiais coletados da ectocérvice e endocérvice.

As lâminas confeccionadas foram fixadas em álcool a 96%, coradas pelo Método de Papanicolaou e analisadas por profissional especializado na área de citopatologia, do Laboratório de Citopatologia do ICB, UFPA. O INCA reconhece o teste citológico de Papanicolaou como muito efetivo no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero. O exame de Papanicolaou consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da ectocérvice e endocérvice do colo do útero e é, atualmente, o meio mais utilizado na rede de atenção básica à saúde por ser indolor barato, eficaz e poder ser realizado em qualquer lugar, por qualquer profissional treinado (Martins *et al.*, 2007).

Considerou-se como lâmina de boa qualidade aquela que contém três tipos de epitélio: epitélio pavimentoso estratificado, epitélio cilíndrico ou glandular e epitélio metaplásico.

Os resultados que apresentaram citologia anormal foram classificados em esfregaço livre de células atípicas, esfregaço inflamatório inespecífico e esfregaço inflamatório provocado por microrganismo. As lesões pré-malignas foram classificadas através do Sistema de Bethesda. Por meio deste sistema as lesões são classificadas em LSIL (lesão de baixo grau), HSIL (lesão de alto grau), ASC-US (células escamosas atípicas de significado indeterminado) e ASC-H (células escamosas atípicas sem excluir a lesão de alto grau), ressaltando aquelas que possuem alterações citopatológicas sugestivas de infecção pelo HPV. Além disso, as alterações citológicas.

As amostras cervicais destinadas à análise por biologia molecular foram coletadas com o auxílio de escovas endocervicais, as quais foram submersas e acondicionadas em frascos contendo 2 mL de solução salina. Após a coleta, essas amostras foram transportadas, através de suportes para tubos, até o Laboratório de Virologia da UFPA, onde foram estocadas a -20°C até o momento da extração de DNA.

2.4 MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.4.1 Extração de DNA

Todas as amostras coletadas, independente do resultado citológico, foram submetidas à extração de DNA total a partir de células oriundas da mucosa genital de acordo com o protocolo do método de extração fenol-clorofórmio, o qual é realizado em três etapas: lise de hemácias; lise de leucócitos e precipitação de proteínas, conforme descrito a seguir:

Em um tubo de 2 mL foi adicionado 1 mL de amostra cervical, submeteu-se o material a uma centrifugação de 14000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado adicionou-se 500 μ L de lise de hemácias. Agitou-se por inversão durante 20 minutos. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. Em seguida desprezou-se o sobrenadante.

Na fase de Lise de leucócitos acrescentou-se ao precipitado 500 μ L de lise de leucócitos. Agitou-se ao vortex até o precipitado ser dissolvido completamente. Prosseguiu-se com a incubação em banho-maria (55°) durante toda a noite.

Para a precipitação de proteínas, ao material incubado adicionou-se 200 μ L de Solução de Proteínas. Agitou-se no vortex e em seguida incubou-se, novamente, em banho-maria (55°). Após 30 minutos de incubação, o material foi centrifugado (14.000 rpm) durante 10 minutos. A fase aquosa foi então transferida para um tubo de 2mL, limpo, no qual se adicionou 500 μ L de fenol-clorofórmio. Agitou-se por inversão durante 10 minutos e em seguida centrifugou-se (14.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante mais uma vez foi transferido para outro tubo, onde acrescentou-se 1,5 mL de isopropanol gelado.

Após a visualização da turvação, centrifugou-se (14.000 pm) por 10 minutos. Então foi acrescentado 200 μ L de etanol a 70% a fim de lavar a parede do tubo. O etanol foi desprezado e tubo foi colocado para secar durante tempo suficiente para que ocorresse a evaporação completa do etanol. A reação foi finalizada com a adição de 80 μ L de água, para a hidratação do DNA obtido.

2.4.2 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

Objetivando garantir a eficácia da reação de extração do DNA, todas as amostras foram submetidas à amplificação do éxon-1 do gene MBL - já que este está presente nas células humanas- conforme descrito por Tin *et al.* (2005) (Figura 6). Uma vez confirmado a presença do DNA foi realizada a PCR, a fim de amplificar um segmento do gene L1 (450 pares de base) do HPV, o qual está relacionado com síntese de proteínas do capsídeo, altamente conservada entre os genótipos (ICTV, 2006). A PCR é uma ferramenta valiosa para a investigação epidemiológica da infecção pelo HPV. A PCR consenso para o gênero detecta mais espécies de HPV genital com maior sensibilidade, além de permitir a análise das variantes, bem como permite a caracterização de novas espécies (Coutlée *et al.*, 2005).

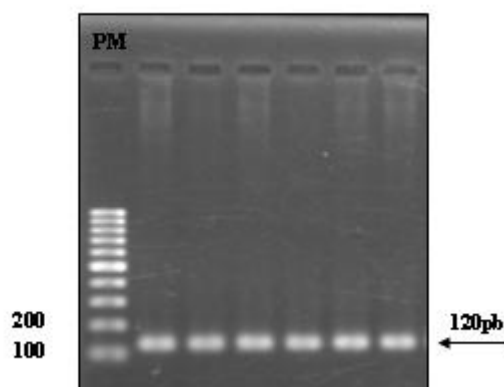


Figura 6 – Perfil eletroforético do fragmento de 120pb amplificado do éxon 1 do gene MBL (PM - peso molecular de 100pb).

A amplificação foi feita no equipamento *Termociclador GeneAmp PCR System 2400*. Na reação de amplificação foi utilizado um volume de 50 μ L contendo 200

ng de DNA extraído; 200 μ M de cada dNTP; 12,5 pmol de cada iniciador; 50 nM de KCL, 2,5 mM de $MgCl_2$; 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 e 1 U de *Taq* polimerase. Os iniciadores consenso envolvidos na reação estão descritos no Quadro 3 (Manos *et al.*, 1989).

Quadro 3 – Iniciadores utilizados na reação de PCR da ORF L1 do HPV.

Iniciadores	Gene	Seqüência 5'-3'
MY09	L1	5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3'
MY11	L1	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial à 95°C por cinco minutos, foram efetivados 40 ciclos de um minuto à 95°C, um minuto à 56°C e um minuto à 72°C, com tempo de cinco minutos para extensão final à 72°C.

2.4.3 Eletroforese

Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2,0%, utilizando tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA- Na_2 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 6 μ L de *Syber-Safe* (INVITROGEN, OREGON, U.S.A.), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.4.4 Seqüenciamento

Após a visualização do produto da PCR (fragmento ORF L1), o DNA amplificado foi submetido ao seqüenciamento automático, através da utilização do kit da *ABI PRISM™ 310 BigDye Terminator v3.1 Matrix Standards (Applied Biosystems)*. As fitas de DNA proviral foram seqüenciadas em ambas as direções, utilizando-se o equipamento de seqüenciamento automático *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Para cada reação, com volume final de 10 µL, misturou-se em um tubo previamente identificado, os seguintes reagentes:

▪ <i>Terminator Read Reaction Mix</i>	0,5µL
▪ Tampão	1,0µL
▪ Produto do PCR purificado	1,0 µL
▪ Iniciadores (12,5pmol/ µL)	1,0 µL
▪ Água deionizada	6,0 µL
Total	10,0 µL

O Terminator Ready Reaction Mix é composto de A-Dye Terminator, G-Dye Terminator, C-Dye Terminator, T-Dye Terminator, dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂, Pirofosfato Termo-estável e AmpliTaq DNA Polimerase, Fs. Em seguida, os tubos contendo a mistura de reagentes foram colocados em um termociclador (*GeneAmp PCR System 2400*) e submetidos a 40 ciclos de um minuto à 95°C, um minuto à 57°C e um minuto à 72°C. No final do processo as amostras foram resfriadas à 4°C.

2.4.5 Precipitação do DNA Seqüenciado

A precipitação do DNA seqüenciado foi realizada de acordo com o protocolo:

1. Adicionar 40 μ L de isopropanol a 65% aos 10 μ L da solução anteriormente seqüenciada;
2. Homogeneizar em agitado mecânico (vórtex);
3. Deixar a temperatura ambiente, não expondo à luz, por 15 minutos;
4. Centrifugar por 25 minutos a 14000 rpm;
5. Desprezar o sobrenadante;
6. Adicionar 300 μ L de etanol a 60%;
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos;
8. Desprezar o sobrenadante;
9. Secar na estufa a 37°C.

2.4.6 Eletroforese do DNA seqüenciado

O sistema de eletroforese utilizou o seqüenciador *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, do ICB-UFPA. A corrida foi realizada utilizando o polímero POP-7TM, em três capilares com 36 cm de comprimento, 0,05 mm de diâmetro interno e 0,06 mm de diâmetro externo, de acordo com o protocolo do fabricante.

2.4.7 Análise das Seqüências Nucleotídicas

2.4.7.1 Edição e Alinhamento das Seqüências

A edição e o alinhamento das seqüências foi realizado por meio do programa BIOEDIT versão 5.0.9 (Hall, 1999), utilizando-se a plataforma Windows.

2.4.7.2 Análise das Seqüências Nucleotídicas

Todas as seqüências nucleotídicas obtidas no trabalho foram comparadas às seqüências do banco de dados do GeneBank/NCBI, utilizando-se o *Blast* – Basic Local Alignment Search Tool - como ferramenta para a genotipagem (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.5 INFERÊNCIA ESTATÍSTICA

Os resultados da prevalência do HPV em mulheres atendidas pelo Laboratório de Citopatologia da UFPA, assim como a correlação dos resultados com as informações epidemiológicas coletadas por meio das entrevistas, foram realizados através da Regressão Logística Múltipla e da Meta-análise (várias proporções) com auxílio do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

O algoritmo referente às etapas metodológicas utilizadas no trabalho está esquematizado na Figura 7.

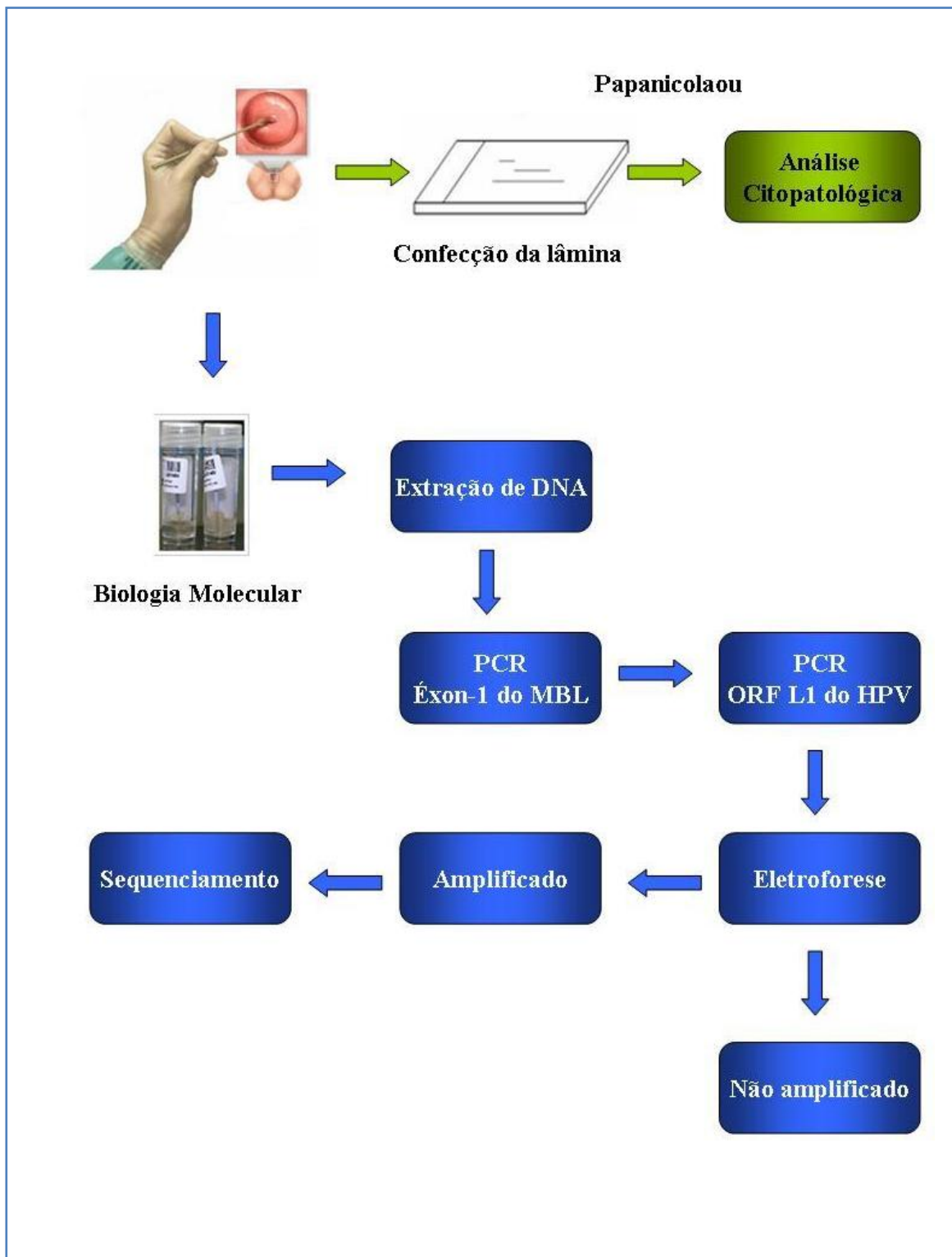


Figura 7 – Organograma da metodologia aplicada no estudo.

3. RESULTADOS

Foram coletadas amostras cervicais de 180 mulheres que se submeteram ao exame preventivo de câncer cervical. Entretanto, 18 amostras (10%) não obedeceram a um dos critérios de inclusão, tendo sido eliminadas da pesquisa.

A média de idade das mulheres incluídas no estudo foi de 37,5 anos (N=162), sendo a idade mínima 17 e a máxima 72. A análise do questionário epidemiológico demonstrou que 49,38% (80/162) das mulheres eram casadas, 34,57% (56/162) possuíam o ensino médio completo e 21,60% (35/162) estavam por concluir o ensino superior. A maioria (89,50%; 145/162) declarou-se como não fumante. A Tabela 1 apresenta as características demográficas do grupo estudado.

Tabela 1 – Características demográficas das mulheres submetidas ao PCCU no Laboratório de Citopatologia, UFPA, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008.

Variáveis demográficas	Número de pessoas	Porcentagem (%)
Idade		
17-28 anos	49	30,25
29-40 anos	52	32,10
41-52 anos	33	20,37
53-64 anos	17	10,49
65-76 anos	09	5,56
Não informado*	02	1,23
Total	162	100
Estado Civil		
Solteira	77	47,53
Casada	80	49,38
Divorciada	04	2,47
Viúva	01	0,62
Total	162	100
Escolaridade		
Analfabeto	01	0,62
Ensino Fundamental Incompleto	25	15,43
Ensino Fundamental Completo	13	8,02
Ensino Médio Incompleto	15	9,26
Ensino Médio Completo	56	34,57
Ensino Superior Incompleto	35	21,60
Ensino Superior Completo	17	10,50
Total	162	100

* Não computado para análise estatística.

Quanto às variáveis epidemiológicas, 37,65% (61/162) informaram que iniciaram a vida sexual entre 13 e 17 anos de idade e 137 mulheres (84,57%) relataram

possuir vida sexualmente ativa. A maioria (58,64%; 95/162) declarou não usar preservativo nas relações sexuais, 38,37% (62/162) faziam uso de contraceptivos, bem como 82,72% (134/162) relataram ter tido até cinco parceiros durante a vida (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das variáveis epidemiológicas do grupo examinado.

Variáveis epidemiológicas	Número de mulheres	Porcentagem (%)
Idade de Início da Vida Sexual		
13-17 anos	61	37,65
18-22 anos	84	51,85
23-27 anos	12	7,41
>28 anos	05	3,09
Total	162	100
Sexualmente Ativa		
Não	25	15,43
Sim	137	84,57
Total	162	100
Uso de Preservativo		
Não	95	58,64
Sim	67	41,36
Total	162	100
Uso de Contraceptivos		
Não	100	61,73
Sim	62	38,27
Total	162	100
Número de Parceiros		
1-5	134	82,72
6-10	24	14,81
11-15	01	0,62
16-20	03	1,85
Total	162	100

No momento da coleta observou-se que 122 mulheres (75,31%) estavam com o colo uterino íntegro macroscopicamente, 11,11% (18/162) estavam com o colo hiperemiado e duas (1,23%) haviam retirado o colo uterino através do procedimento de histerectomia total. A maioria (67,28%; 109/162) referiu ter pelo menos um sintoma, dentre os quais a presença de secreção vaginal de coloração branco-leitoso foi o mais citado (33,03%; 36/109), seguido da secreção vaginal de coloração amarelo-claro (26,61%; 19/109) e secreção branco-leitoso acompanhado de prurido (12,84%; 14/109) (Figura 8).

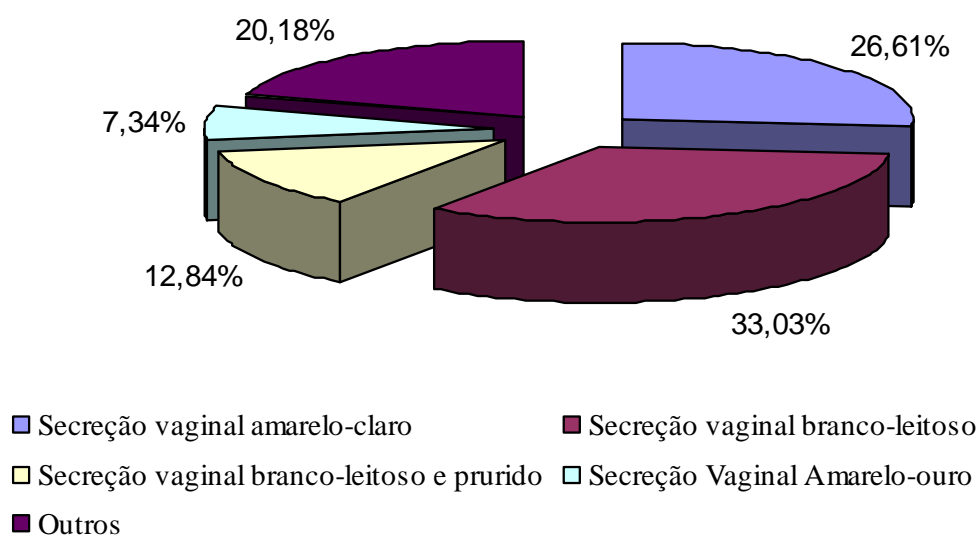


Figura 8 – Proporção dos sintomas referidos pelas mulheres submetidas ao PCCU no Laboratório de Citopatologia, UFPA, no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008.

A análise citológica das lâminas revelou que 62,35% (101/162) apresentavam alterações citológicas, dentre as quais 62 mulheres (61,39%)

apresentavam esfregaço com alterações sugestivas de infecção por microrganismos, 24,75% (25/101) apresentaram esfregaço inflamatório inespecífico. De acordo com o Sistema de Bethesda, 12,87% (13/101) dos esfregaços possuíam alterações pré-malignas, onde a lesão classificada em ASC-US foi encontrada em 38,46% dos casos (5/13). A alteração coilocitose, sugestiva da infecção pelo HPV, foi encontrada em três esfregaços de lesões pré-cancerígenas: LSIL, HSIL e ASC-H. O resultado do exame preventivo está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado do PCCU das mulheres atendidas no Laboratório de Citopatologia da UFPA.

Resultado do PCCU	Número de mulheres	Porcentagem (%)
Ausência de células atípicas	61	37,65
Inflamatório inespecífico	25	15,43
Inflamatório por microrganismos	62	38,27
Lesões pré-malignas		
LSIL	02	1,24
HSIL	03	1,85
ASC-US	05	3,09
ASC-H	02	1,85
Neoplasia	02	0,62
Total	162	100

Dentre as amostras com citologia normal (N=61), a maioria (34,43%; 21/61) estava em idade reprodutiva, correspondente ao intervalo de 17 a 28 anos, 57,38% (35/61) eram solteiras e 34,43% (21/61) possuíam ensino médio completo. No

que diz respeito s variáveis epidemiológicas, verificou-se que 34 mulheres (55,74%) iniciaram a atividade sexual entre 18 e 22 anos de idade, 81,97% (50/61) declararam-se ser sexualmente ativas, 37 (60,66%) informaram não fazer uso de preservativos nas relações sexuais. O uso de contraceptivos foi relatado por 54,1% (33/61). A realização regular do exame preventivo foi informada por 67,21% das mulheres (41/61) e 54 (88,52%) mulheres referiram ter tido até cinco parceiros durante a vida.

No grupo de mulheres com lesões pré-malignas (N=13) observou-se que 61,54% (08/13) eram casadas. Assim como 46,15% (06/13) iniciou a atividade sexual entre 18 e 22 anos de idade, nove mulheres (69,23%) declararam-se sexualmente ativa e referiram o uso de contraceptivos. Sete mulheres (53,85%) informaram ter relações sexuais desprotegidas e 38,46% (5/13) nunca haviam feito o exame preventivo.

Todas as amostras, independente do resultado citológico, foram submetidas à PCR, a fim de amplificar um segmento da ORF L1 (450pb) do HPV. A visualização do produto da PCR (Figura 9) demonstrou que 30 amostras, das 162 envolvidas no estudo, amplificaram o segmento alvo, o que corresponde a uma prevalência de 18,52%.

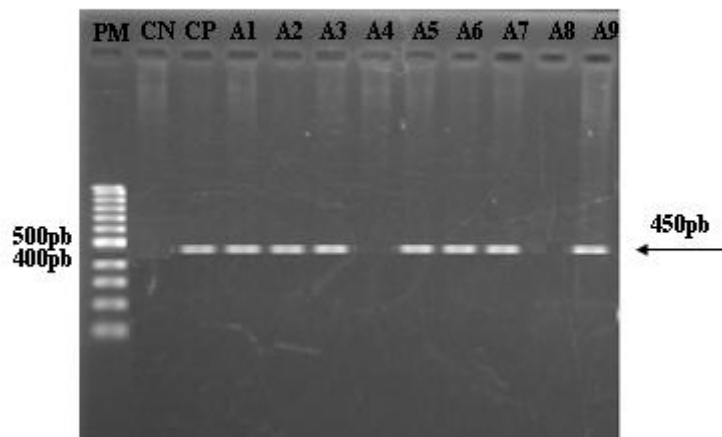


Figura 9 – Perfil eletroforético do fragmento de 450pb amplificado da ORF L1 do HPV. PM – peso molecular de 100 pb. CN - controle negativo. CP - controle positivo. A1, A2, A3, A5, A6, A7 e A9 – amostras positivas. A4 e A8 – amostras negativas.

No grupo de mulheres com PCR positivo para HPV a média de idade foi de 40 anos. Dezesete (56,67%) eram solteiras e 36,67% (11/30) haviam concluído o ensino médio (Tabela 4).

Tabela 4 – Características demográficas das mulheres positivas na PCR.

Variáveis demográficas	Número de mulheres	Porcentagem (%)
Idade		
17-28 anos	10	33,33
29-40 anos	13	43,34
41-52 anos	04	13,33
53-64 anos	01	3,33
65-76 anos	02	6,67
Total	30	100,00
Estado Civil		
Solteira	17	56,67
Casada	12	40,00
Divorciada	01	3,33
Total	30	100
Escolaridade		
Analfabeto	01	3,33
Ensino Fundamental Incompleto	02	6,67
Ensino Fundamental Completo	02	6,67
Ensino Médio Incompleto	01	3,33
Ensino Médio Completo	11	36,67
Ensino Superior Incompleto	10	33,33
Ensino Superior Completo	02	6,67
Total	30	100

Quanto às características epidemiológicas, 80% (20/30) das infectadas declararam-se sexualmente ativa; 53,33% (16/30) referiram o uso de preservativo nas relações sexuais e 90% (19/30) informaram não fazer uso de anticoncepcional. Dezesete mulheres (56,67%) faziam o exame preventivo de câncer de colo uterino

regularmente, uma vez ao ano e 40% (12/30) relataram ter tido até cinco parceiros durante a vida.

Em relação ao aspecto do colo uterino, 76,67% (23/30) não apresentaram alterações macroscópicas e 83,33% (25/30) relataram ter pelo menos um sintoma. Dentre os sintomas relatados, a secreção vaginal de coloração branco-leitoso foi o mais referido (32,00%; 8/30) (Figura 9). Na Tabela 5 estão contidas as características epidemiológicas do grupo infectado.

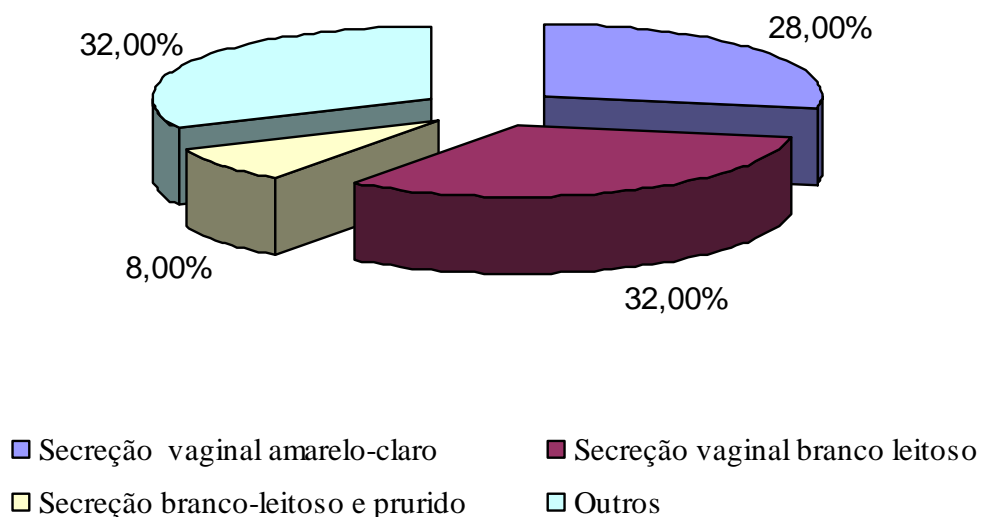


Figura 10 – Proporção dos sintomas referidos pelas mulheres submetidas ao PCCU e com positividade na PCR.

Tabela 5 – Características epidemiológicas das mulheres submetidas ao PCCU e com positividade na PCR.

Variáveis epidemiológicas	Número de Mulheres	Porcentagem (%)
Idade de Início da Vida Sexual		
13-17 anos	12	40,00
18-22 anos	11	36,67
23-27 anos	04	13,33
>28 anos	03	10,00
Total	30	100,00
Sexualmente Ativas		
Não	06	20,00
Sim	24	80,00
Total	30	100,00
Uso de preservativo		
Não	14	46,67
Sim	16	53,33
Total	03	100,00
Uso de anticoncepcional		
Não	19	90,00
Sim	11	10,00
Total	30	100,00
Preventivo		
Nunca	08	26,67
Regularmente	17	56,67
Ocasionalmente	05	16,67
Total	30	100

Das 30 amostras positivas na PCR, treze (43,34%) apresentaram esfregaço livre de alterações citológicas, enquanto que 20% (06/30) apresentaram

esfregaço inflamatório inespecífico, 23,33% (07/30) com esfregaço sugestivo de infecção por microrganismos. Quatro amostras (13,33%) eram de lesões pré-malignas, sendo que duas (6,67%) apresentaram LSIL, uma (3,33%) ASC-H e uma (3,33%) ASC-US.

Foram identificadas treze espécies diferentes de HPV (Tabela 6). A maioria (66,67%; 20/30) das espécies identificadas pertencia ao grupo de baixo risco, onde o HPV-11 foi o mais freqüente (40%; 12/30), seguido do HPV-81 (6,67%; 2/30), HPV-61 (6,67%; 2/30), HPV-06 (3,33%; 1/30), HPV-54 (1/30), e HPV-72 (1/30) (Tabela 6). Uma amostra apresentou infecção pelo HPV-53, considerado como de risco intermediário.

Em relação ao grupo infectado por espécies de baixo risco observou-se uma predominância da infecção em mulheres com idade entre 29 e 40 anos (50%; 10/20), em mulheres solteiras (55%; 11/20) assim como em mulheres que iniciaram a vida sexual entre 23 e 27 anos (55%; 11/20). Em relação ao uso de preservativo a distribuição da infecção foi equivalente. A maioria (65%; 13/20) também referiu pelo menos um sintoma.

Tabela 6 – Distribuição das espécies de HPV encontradas e a similaridade entre as sequências encontradas e as depositadas do *geneBank*.

Espécie encontrada	Número	Porcentagem (%)	Similaridade entre as sequências (%)
HPV-6	01	3,33	94
HPV-11	12	40,00	93 a 100
HPV-16	01	3,33	99
HPV-18	01	3,33	100
HPV-31	04	13,34	94 a 99
HPV-52	02	6,67	91 e 99
HPV-53	01	3,33	99
HPV-54	01	3,33	99
HPV-58	01	3,33	98
HPV-61	02	6,67	100
HPV-72	01	3,33	91
HPV-81	02	6,67	97 e 99
HPV-89	01	3,33	89
Total	30	100	

Nove amostras (30%) apresentaram infecção por espécies de alto risco, sendo quatro de HPV-31 (44,45%) (Tabela 7). As espécies de alto risco apresentaram distribuição semelhante entre as faixas etárias, e entre o estado civil, sendo predominante em mulheres que iniciaram a atividade sexual entre 18 e 22 anos de idade (66,67%; 6/9), entre aquelas que realizavam o exame preventivo regularmente (77,78%; 7/9). No que se refere ao número de parceiros verificou-se que oito mulheres (88,89%) tiveram até 10 parceiros sexuais em toda a vida. A presença de sintomas foi referida por seis mulheres (66,67%).

A distribuição das espécies de HPV em função do resultado citológico (Tabela 7) demonstrou que ocorrência da infecção foi maior no grupo de mulheres cujo esfregaço celular era livre de alterações citológicas (43,33%), no qual a taxa de infecção por espécies de alto risco foi maior (55,56%; 5/9). No grupo que apresentaram lesões pré-malignas só observou-se a ocorrência de espécies de HPV de baixo risco.

Tabela 7 – Distribuição das espécies de HPV identificadas na população examinada, de acordo com o resultado citológico e potencial oncogênico.

Resultado Citológico	Potencial oncogênico		
	Baixo Risco (N)*	Risco Intermediário (N)*	Alto Risco (N)*
Ausência de células atípicas	HPV-11 (6)	HPV-53 (01)	HPV-16 (01)
	HPV-61 (01)		HPV-31 (02)
	HPV-72 (01)		HPV- 52 (01)
			HPV-58 (01)
Inflamatório Inespecífico	HPV 11 (02)		HPV-31 (02)
	HPV-89(01)		HPV-52 (01)
	HPV-81(01)		HPV-18 (01)
Inflamatório sugestivo de infecção por microrganismos	HPV-6 (01)		
	HPV-11 (02)		
	HPV-61 (01)		
Pré-maligna	HPV-11 (01)		
	HPV-81 (01)		
	HPV-54 (01)		

* Número encontrado de cada espécie.

A análise estatística (Regressão Logística Múltipla) do questionário epidemiológico demonstrou forte associação entre infecção pelo HPV e o estado sexualmente ativo da mulher ($p=0.0015$), bem como com a frequência na realização do exame preventivo ($p=0.0392$). A probabilidade de infecção pelo HPV em mulheres sexualmente ativa e que nunca fez o PCCU é de 11,27 vezes.

Dentre as amostras positivas na PCR, a meta-análise revelou diferença estatisticamente significativa entre as proporções das categorias de resultado citológico: ausência de células atípicas e lesão pré-maligna ($p<0.05$).

Não houve associação entre a infecção por HPV com as seguintes variáveis: idade, estado civil, escolaridade, idade de início da atividade sexual, número de parceiros sexuais na vida, uso de método contraceptivo hormonal, tempo de uso de contracepção hormonal e presença de sintomas, conforme descrito nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Características demográficas da população estudada, em função do resultado do PCCU e da biologia molecular.

Variáveis demográficas	Resultado Citológico					N	PCR		<i>p-valor</i>
	N*	II*	IM*	PM*	Np*		Neg	Pos	
Idade									0.8604
17-28 anos	21	07	19	02	-	49	39	10	
29-40 anos	21	03	24	04	-	52	39	13	
41-52 anos	11	07	12	02	01	33	29	4	
53-64 anos	04	05	04	04	-	17	16	01	
65-76 anos	04	03	01	-	01	08	07	02	
Não informado	-	-	02	-	-	02	02		
Total						162	132	30	
Estado Civil									0.0869
Solteira	35	11	27	03	01	77	61	16	
Casada	25	13	33	08	01	80	77	13	
Divorciada	01	01	01	01		04	03	01	
Viúva	-	-	01	-	-	01	01	-	
Total						162	132	30	
Escolaridade									0.8853
Analfabeto	01	-	-	-	-	01	-	01	
Fund. Incompleto	05	03	13	03	01	25	23	02	
Fund. Completo	04	03	04	01	01	13	11	02	
Médio Incompleto	07	02	04	02	-	15	14	01	
Médio Completo	21	11	22	02	-	56	44	12	
Sup. Incompleto	14	04	14	03	-	35	25	10	
Sup. Completo	09	02	05	01	-	17	15	02	
Total						162	132	30	

N* - ausência de células atípicas. II* Inflamatório inespecífico. IM* Inflamatório provocado por microrganismos. PM* Lesão pré-maligna. Np* Neoplasia.

Tabela 9 – Características epidemiológicas da população estudada, em função do resultado do PCCU e da biologia molecular.

Variáveis epidemiológicas	Resultado Citológico					N	PCR		p- valor
	N*	II*	IM*	PM*	Np*		Neg	Pos	
Início da Vida Sexual									0.5429
(anos)									
13-17 anos	21	06	30	03	01	61	49	12	
18-22 anos	34	14	29	06	01	84	73	11	
23-27 anos	04	04	02	02	-	12	08	04	
>28 anos	02	01	01	01	-	05	02	03	
Total						162	132	30	
Sexualmente Ativa									0.0015
Não	11	06	04	03	01	25	19	06	
Sim	50	19	58	09	01	137	113	24	
Total						162	132	30	
Uso de Preservativo									0.3080
Não	37	14	36	07	01	95	80	15	
Sim	24	11	26	05	01	67	52	15	
Total						162	132	30	
Uso de Contraceptivos									0.8532
Não	28	18	43	09	02	100	51	19	
Sim	33	07	19	03	-	62	81	11	
Total						162	132	30	
Número de Parceiros									0.3632
1-5	54	20	50	09	01	134	107	27	
6-10	06	14	10	03	01	24	21	03	
11-15	-	01	-	-	-	01	01	-	
>16	01	-	02	-	-	03	03	-	
Total						162	132	30	

N* - ausência de células atípicas. II* Inflamatório inespecífico. IM* Inflamatório provocado por microrganismos. PM* Lesão pré-maligna. Np* Neoplasia.

(continuação)

Tabela 9 – Características epidemiológicas da população estudada, em função do resultado do PCCU e da biologia molecular.

Variáveis epidemiológicas	Resultado Citológico (*)					N	PCR		p- valor
	N*	II*	IM*	PM*	Np*		Neg	Pos	
Preventivo									0.0392
Nunca	07	04	09	05	01	26	18	08	
Regularmente	41	15	47	03	01	107	90	17	
Ocasionalmente	13	06	06	04	-	29	24	05	
Total		162	132	30		162	132	30	
Sintomas									0.0515
Ausência	21	10	13	07	02	53	48	25	
Presença	40	15	49	05	-	109	84	05	
Total						162	132	30	

N* - ausência de células atípicas. II* Inflamatório inespecífico. IM* Inflamatório provocado por microrganismos. PM* Lesão pré-maligna. Np* Neoplasia.

4. DISCUSSÃO

O câncer de colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres brasileiras, sendo que a região norte do Brasil é a área de maior incidência (22/100.000 habitantes) (INCA, 2008). A presença da infecção por espécies de HPV de alto risco tem demonstrado forte associação com o desenvolvimento de câncer cervical (Del Mistro, 2006; Chacón *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Siriaunkgul *et al.*, 2008). Por este motivo, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde Brasileiro, prioritariamente, para mulheres entre 25 e 59 anos de idade (INCA, 2008).

As técnicas de biologia molecular são mais eficazes na detecção do HPV, entretanto elas não podem substituir o PCCU uma vez que este exame descreve muitos aspectos citológicos que vão além daqueles que evidenciam a presença do HPV e que não podem ser evidenciados pelas técnicas de biologia molecular. Além do que, a infecção pelo HPV não implica necessariamente em neoplasia, logo casos de malignidade podem ser negligenciados pela análise por biologia molecular.

O resultado citológico da população estudada demonstrou que 8,02% (13/162) dos esfregaços possuíam algum tipo de alteração citológica pré-maligna, dentre as quais a ASC-US foi encontrada na maior parte dos casos (38,46%; 5/13), seguido de HSIL (20,08%) e de LSIL (15,38%). Esses dados se assemelham aos resultados obtidos por All *et al.* (2007), no Egito, no qual 7,8% dos esfregaços apresentavam anormalidades citológicas, dentre os quais 34,4% correspondiam a ASC-US. Uma maior prevalência de alterações pré-malignas (97,67%) também foi encontrada no Hospital Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, com predominância de HSIL (18,60%). Esta diferença pode ser decorrente do fato que o hospital é uma

unidade de saúde de alta complexidade, o que sugere que as mulheres nele atendidas podem procurar o serviço quando já apresentam um grau elevado de comprometimento de saúde.

Na cidade de Cruzeiro do Sul, Estado do Acre, foi encontrada uma prevalência menor (5,4%) de lesões pré-malignas, quando comparados com o resultado do presente estudo, onde se detectou 35,18% de ASC-US, seguido de HSIL (33,33%) e LSIL (12,96%) (Von Zuben *et al.*, 2007). Este fato pode ser devido às diferenças no tamanho amostral uma vez que o presente estudo envolveu 162 amostras, enquanto que o estudo referido investigou 2.226 mulheres.

O presente estudo identificou uma prevalência da infecção pelo HPV em 18,52% das amostras investigadas. Esses dados corroboram com os achados de Lopes *et al.* (2001) o qual identificou uma prevalência de 19,1% do HPV em mulheres de uma penitenciária da cidade de São Paulo. Essa mesma prevalência também foi descrita por Lenselink *et al.* (2008) em um estudo conduzido nos Países Baixos. Entretanto, a prevalência identificada no presente estudo foi menor que a encontrada Noronha *et al.* (1999) em estudo conduzido na cidade de Belém (59,65%). Essas divergências podem ser decorrentes do tipo de amostra envolvida nos estudos, já que no estudo anterior utilizou-se amostras de biópsias do colo uterino de pacientes portadoras o de lesões na cérvix uterina, enquanto que o presente estudo envolveu amostras de pacientes submetidas a triagem para o câncer cervical.

Na cidade do Rio de Janeiro também foi identificada uma maior prevalência da infecção pelo HPV, correspondente a 50,1% da população analisada (Freitas *et al.* 2007). A alta prevalência do HPV (45,3%) também foi reportada por Pannier-Stockman *et al.* (2008), na França. A divergência entre os resultados de

prevalência obtidos no presente estudo e os descritos na literatura pode ser decorrente do fato de que as mulheres atendidas no Laboratório de Citopatologia (UFPA) são de demanda espontânea e se submetem ao PCCU sem terem sido previamente examinada por um especialista na área ginecológica, o que garante que as mulheres não apresentavam evidências de lesões no colo uterino que mereçam uma investigação detalhada, ao contrário dos estudos citados em que a coleta das amostras foi realizada em centros de saúde especializados.

No presente trabalho foram identificadas 13 espécies diferentes de HPV, sendo que 66,67% correspondia a espécies de baixo risco, dentre os quais o HPV-11 foi o mais prevalente (40%), sendo a faixa etária de 29 a 40 anos a mais atingida. Essa prevalência foi menor que a encontrada por Zampirolo *et al.* (2007), em Santa Catarina, onde identificaram espécies de baixo risco em 36,6% das amostras analisadas, sendo a prevalência predominante em mulheres com idade inferior a 25 anos. A baixa prevalência de espécies de baixo risco (18,91%) também foi descrita por Lopes *et al.* (2001) na cidade de São Paulo. A diferença entre as taxas de prevalência de espécies de baixo risco podem estar relacionadas à diferença entre as metodologias empregada nos estudos, uma vez que o presente estudo fez a identificação através do seqüenciamento das bases nucleotídicas, o qual permite a identificação de um maior número de espécies, enquanto que os estudos mencionados utilizaram o teste de Captura Híbrida para a identificação das espécies e esse teste contém sondas para apenas 5 espécies de baixo risco (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43 e HPV-44) (Noaves *et al.*, 2006; Castle *et al.*, 2008).

No que se refere às espécies de alto risco a prevalência encontrada no presente estudo foi de 30%, sendo o HPV-31 foi o mais freqüente (44,45%). Esta

prevalência foi menor que a encontrada por Watt *et al.* (2009), na Jamaica, onde as espécies de alto risco tiveram uma prevalência de 80,2% e o HPV-45 e o HPV-58 foram os mais freqüentes, identificados em 21,7% e 18,8%, respectivamente. A alta prevalência (81,09%) também foi encontrada por Lopes *et al.* (2001), na cidade de São Paulo. Em mulheres indígenas, na Planície do Norte, Bell *et al.* (2007) verificaram a infecção por espécies de alto risco em 67,2% das amostras analisadas, sendo o HPV-16 o mais prevalente (31,71%).

A comparação entre o resultado citológico e a infecção pelo HPV, no presente trabalho, revelou que mulheres sem alterações citológicas apresentavam maior prevalência do vírus (43,34%) e nos esfregaços com lesões pré-malignas a prevalência encontrada foi de 30,47%. Esses resultados divergem dos achados de Carvalho *et al.* (2005), na cidade do Rio de Janeiro, em que 25% da infecção foi detectada em mulheres com citologia normal e entre as mulheres com lesões pré-malignas a prevalência foi de 100%. Em Belo Horizonte, Freitas *et al.* (2007) identificaram o HPV em 94,4% das lesões pré-malignas. A maior prevalência em mulheres sem anormalidades citológicas, encontrada no presente estudo, pode ser decorrente do fato de que as infecções pelo HPV são, em sua maioria assintomática, e o desenvolvimento de alterações citológicas, pode levar anos após o início da infecção (Burd, 2003).

Dentre o grupo de mulheres infectadas, no presente trabalho, a média de idade foi de 35 anos e verificou-se uma redução na prevalência da infecção à medida que a idade aumentava. Esses resultados se assemelham aos resultados obtidos por Veteramo *et al.* (2009), em Roma. Alguns estudos sugerem que a infecção pelo HPV ocorre nos primeiros anos pós o início da atividade sexual, uma vez que se tem observado uma maior incidência em mulheres com idade inferior a 25 anos (Moscicki,

2007; Coupé *et al.*, 2008; Rama *et al.*, 2008). A redução da ocorrência da infecção nas mulheres com maior idade encontrada no presente estudo pode ser justificada pela aquisição do matrimônio e, conseqüente redução no número de parceiros.

Dentre as variáveis epidemiológicas analisadas no estudo, a atividade sexual e a frequência na realização do PCCU mostraram associação estatisticamente significativa com a infecção pelo HPV. Não houve associação entre as variáveis: idade, estado civil, escolaridade, idade de início da atividade sexual, número de parceiros sexuais na vida, uso de método contraceptivo hormonal, tempo de uso de contracepção hormonal e presença de sintomas. Esses dados divergem dos resultados obtidos por Rama *et al.* (2008) nas cidades de São Paulo e Campinas, onde todas as variáveis epidemiológicas apresentaram forte associação com a infecção. Por outro lado, no nordeste brasileiro, Fernandes *et al.* (2009) verificaram a associação entre a idade, o número de parceiros, o tabagismo e atividade sexual. A associação entre a idade, a escolaridade, a idade da primeira relação sexual e o tabagismo também foi verificada por Pereira *et al.* (2007), na cidade do Rio de Janeiro, bem como por Sellors *et al.* (2000) na cidade de Ontário, no Canadá.

5. CONCLUSÕES

1. A prevalência da infecção pelo HPV (18,52%) em mulheres investigadas para o câncer cervical e atendidas no Laboratório de Citopatologia, UFPA, mostrou-se inferior à prevalência descrita em outros Estados brasileiros.
2. As espécies de HPV identificadas no presente estudo eram, em sua maioria, de baixo risco (66,67%; 20/30). Entretanto, a identificação de espécies com alto potencial oncogênico (30%) sugere o acompanhamento clínico e investigação detalhada das mulheres infectadas a fim de evitar a evolução desses casos para a neoplasia.
3. A ocorrência da infecção observada no grupo de mulheres com esfregaços livres de alterações citológicas foi elevada (43,33%), o que reforça a idéia de que a infecção pelo HPV não provoca, de imediato, alterações citológicas.
4. O presente estudo verificou a associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV, a atividade sexual e a realização regular do exame preventivo de câncer de colo uterino.
5. A ocorrência da infecção foi predominante nas mulheres solteiras, com idade entre 29 e 40 anos (50%) e que iniciaram a vida sexual entre 23 e 27 anos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALL, H. S. S., REFAAT, A., E DANDASH, K. Prevalence of cervical neoplastic lesions and Human Papillomavirus infection in Egypt: National Cervical Cancer Screening Project. **Infectious Agents and Cancer**, **2**: 2-12, 2007.
- ANTONSSON, A., KARANFILOVSKA, S., LINDQVIST, P.G., E HANSSON, B.G. General Acquisition of Human Papillomavirus Infections of Skin Occurs in Early Infancy. **Journal of Clinical Microbiology**, **41** (6): 2509–2514, 2003.
- AULT, K.A. Epidemiology and natural history of human Papillomavirus infections in the female genital tract. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, **2006**: 1-5, 2006.
- AYRES, M., AYRES, J.R. JR, AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0**. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, 2007.
- BAO Y.P., LIY, N., SMITHZ, J.S., QIAO Y.L., ACCPAB members. Human Papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. **International Journal of Gynecological Cancer**, **18**(1): 71-79, 2007.
- BARDIN, A., VACCARELLA, S., CLIFFORD, G.M., LISSOWSKA, J., REKOSZ, M., BOBKIEWICZ, P., KUPRYJAN´ CZYK, J., KRYNICKI, R., JONSKA-GMYREK, J., DANSKA-BIDZINSKA, A., SNIJDERS, P.J.F., MEIJER, C.J.L.M., ZATONSKI, W., FRANCESCHI, S. Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Warsaw, Poland. **European Journal of Cancer**, **44**(4): 557-564, 2007.

- BECHTOLD, V., BEARD, P., RAJ, K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. **Journal of Virology**, **77(3)**: 2021-2028, 2003.
- BELL, M. C., SCHMIDT-GRIMMINGER, D., PATRICK, S., RYSCHON, T., LINZ, L., E CHAUHAN, S. C. High prevalence of human papillomavirus infection in American Indian women of the Northern Plains. **Gynecologic Oncology**, **107(2)**: 236-241, 2007.
- BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, **32S**: S1-S6, 2005.
- BOSCH, F.X., DE SANJOSE, S. Human papillomavirus in cervical cancer, review. **Current Oncology Reports**, **4**: 175-183, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2007, p. 32-33; p. 49.
- BRENNAN, S.M.F., SYRJÄNEN, K.J. Regulation of cells cycle is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Medical Journal**, **121(3)**: 128-132, 2003.
- BRINKMAN, J. A., XU, X., E KAST, W.M. The efficacy a DNA vaccine containing inserted and replicated regions of the E7 gene for treatment of HPV 16 induced tumors. **Vaccine**, **25(17)**: 3437-3444, 2007.
- BULK, S., ROZENDAAL, L., ZIELINSKI, Z.D., BERKHOF, J., DAALMEIJER, N.C.F., SNIJDERS, P.J.F., VAN KEMENADE, F.J., MEIJER, C.J.L.M. High-risk HPV is present cytologically false negative smears: an analysis of "normal" smears preceding CIN2/3. **Journal of Clinical Pathology**, **61**: 385-389, 2008.

- BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, **16(1)**: 1–17, 2003.
- CAMPOS, M. S. Animal modes of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, **89**: 249-261, 2002.
- CARVALHO M. O. O., CARESTIATO F. N., PERDIGÃO P. H., XAVIER M. P. P. T., SILVA K. C., BOTELHO M. O. Human Papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **9(5)**: 398-404, 2005.
- CASTLE, P. E., SOLOMON, D., WHEELER, C. M., GRAVITT, P. E., WACHOLDER, S., SCHIFFMAN, M. Human Papillomavirus genotype specificity of hybrid capture. **Journal of clinical microbiology**, **46**: 2595–2604, 2008.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Genital HPV Infection - CDC Fact Sheet**. Centers for Disease Control and Prevention. 2004.
- CENTURIONI, M.G., PUPPO, A., MERLO, D.F., PASCIUCCO, G., CUSIMANO, E.R., SIRITO, R., GUSTAVINO, C.A. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. **BMC Infectious Disease**, **5**: 77, 2005.
- CHACÓN, J., SANZ, I., RUBIO, M.D., DE LA MORENA, M.L., DÍAZ, E., MATEOS, M.L., BAQUERO, F. Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, **25(5)**: 311-316, 2007.
- CHRISTENSEN NEIL D., HÖPFL R., DIANGELO S. L., CLADEL N. M., PATRICK S. D., WELSH P. A., BUDGEON L. R., REED C. A. e KREIDER J. W. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like

- particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. **Journal of General Virology**, **75**: 2271-227, 1994.
- CLIFFORD. G., SMITH, J.S., AGUADO, T., FANCESCHI, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta analysis. **British Journal of Cancer**, **89**: 101-105, 2003.
- COUPLÉE, F., ROULEAU, D., FERENCZY, A., FRANCO, E. The Laboratory diagnosis of genital human papillomavirus infections. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, **16(2)**: 83-91, 2005.
- CULP, T. D., SPATZ, C. M., REED, C. A., e CHRISTENSEN, N.D. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. **Virology**, **361(2)**: 435–446, 2007.
- DANOS, O., KATINKA, M., YANIV, M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. **The EMBO Journal**, **1(2)**: 231-236, 1982.
- DAWAR, M., DEEKS, S., DOBSON, S. Human papillomavirus vaccines launch a new era in cervical cancer prevention. **Canadian Medical Association of Journal**, **177(5)**: 456-461, 2007.
- DE VILLIERS, E.M., FAUQUET, C., BROKER, T.R., BERNARD, H.U, HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, **324**: 17-27, 2004.
- DEL MISTRO, A., SALAMANCA, H. F., TREVISAN, R., BERTORELLE, R., PARENTI, A., BONOLDI, E., ZAMBON, P., MINUCCI, D. Human papillomavirus typing of invasive cervical cancers in Italy. **Infectious Agents and Cancer**, **December, 1**: 9, 2006.

- DEL PRETE, R., DI TARANTO, A.M., LIPSI, M. R., NIRCHIO, V., ANTONETTI, R., E MIRAGLIOTTA, G. Prevalence and genotypes identification of human papillomavirus infection in a population of South Italy. **Journal of Clinical Virology**, **42(2)**: 211-214, 2007.
- DEL VECCHIO, A.M., ROMANCZUK, H., HOWLEY, P.M., BAKER, C.C. Transient replication of human papillomavirus DNAs. **Journal of Virology**, **66(10)**: 5949-5958, 1992.
- DELLA TORRE., G., DONGHI, R., LIMA, P.O.C., PILOTTI, S., KORONEL,R., PIEROTTI, M.A., DE PALO, G., PORTA, G. D., RILKE, F. Human papillomavirus genomes in male urethral cells. **American Journal of Pathology**, **141(5)**: 1181-1186, 1992.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, **110**: 525-541, 2006.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, **32S**: S7-S15, 2005.
- DOORBAR, J., ELSTON, R.C., NAPHTHINE, S., RAJ, K., MEDCALF, E., JACSON, D., COLEMAN, N., GRIFFIN, H.M, MASTERSON, P., STACEY, S., MENGISTU, Y., DUNLOP, J. The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associated with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. **Journal of Virology**, **74**: 10081-10095, 2000.
- DUEÑAS-GONZÁLEZ, A., LIZANO, M., CANDELARIA, M. CETINA, D., ARCE, C., CERVERA, E. Epigenetics of cervical cancer an overview and therapeutic perspectives. **Molecular Cancer**, **October**, **4**: 38, 2005.

- DUENSING, S., LEE, L.Y., BASILE, J., PIBOONNIYON, S., GONZALEZ, S., CRUM, C.P., MÜNGER, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Cell Biology**, **29(18)**: 10002-10007, 2000.
- DUNNE, E.F., MARKOWITZ, L.E. Genital human papillomavirus infection. **Clinical Infections Diseases**, **43**: 624-629, 2006.
- EVANDER, M., FRAZER, PAYNE, E., QI, Y.M., HENGST, K., MCMILLAN, N.A. Identification of the α_6 integrin as candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of Virology**, **71(3)**: 2449-2456, 1997.
- FEHRMANN F, KLUMPP DJ, LAIMINS LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. **Journal of Virology**, **77**: 2819–31, 2003.
- FERNANDES, J. V., MEISSNER, R. V., CARVALHO, M. G. F., FERNANDES, T. A. A. M., AZEVEDO, P. R. M., VILLA, L. V. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, **105(1)**: 21-4, 2009.
- FINAN, R.R., IRANI-HAKIME, N., TAMIM, H., ALMAWI, W.Y. Molecular diagnosis of Human papillomavirus: comparison between cervical and vaginal sampling. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, **9**: 119–122, 2001.
- FINNEM, R.L., ERICSON, K.D., CHEN, X.S., GARCEA, R.L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. **Journal Virology**, **77(8)**: 4818-4826, 2003.

- FRANCO, E.L., DUARTE-FRANCO, E., FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**, **164(7)**: 1027-1025, 2001.
- FREITAS, T. P., CARMO, B. B., PAULA, F. D. F., RODRIGUES, L. F. FERNANDES, A. P.; FERNANDES, P. A. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **49(5)**: 297-301, 2007.
- GALL.S.A. Female genital warts: global trends and treatments. **Infectious Diseases of Obstetrics Gynecological**, **9**: 149–154, 2001.
- GARLAND, S.M., TABRIZI, S.N., CHEN, S., BYAMBAA, C., DAVAAJAV, K. Prevalence of sexually transmitted infections (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* and human papillomavirus) in female attendees of a sexually transmitted diseases clinic in Ulaanbaatar, Mongólia. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, **9**: 143-146, 2001.
- GARNETT, T.O., DUERKSEN-HUGES, J.P. Modulation of apoptosis by human Papillomavirus (HPV) oncoproteins. **Archives of Virology**, **151(12)**: 2321-2335, 2006.
- GIRALDO, P.C., ELEUTÉRIO, J.JR., CAVALCANTE, D.I.M., GONÇALVES, A.K.S., ROMÃO, J.A.A., ELEUTÉRIO, R.M.N. The role of high-risk HPV-DNA testing in the male sexual partners of women with HPV-induced lesions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, **137(1)**: 88-91, 2008.

- GOVAN, V. A. A novel vaccine for cervical cancer: quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) recombinant vaccine (Gardasil®). **Therapeutics and Clinical Risk Management**, **4(1)**: 65–70, 2008.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, **41**: 95-98, 1999.
- HARPER D.M, FRANCO E.L, WHEELER C., FERRIS, G.D., JENKINS, D., SCHUIND, A., ZAHAF, T., INNIS, B., NAUD, P., CARVALHO, N.S., ROTELI-MARTINS, C.M., TEIXEIRA, J., BLATTER, M.M., KORN, A.P., QUINT, W., DUBIN, G. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human Papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomized controlled trial. **The Lancet**, **364**: 1757-65, 2004.
- HEINO, P., ZHOU, J., LAMBERT, P.F. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral cápside protein L2. **Virology**, **276**: 304-314, 2000.
- HERRINGTON, C.S. Human papillomaviruses and cervical neoplasia.II Interaction of HPV with other factors. **Journal of Clinical Pathology**, **48**: 1-6, 1995.
- HOFFMAN, R., HIRT, B., BECHTOLD, V., BEARD, P., RAJ, K. Different modes of human Papillomavirus DNA replication during maintenance. **Journal of Virology**, **80(9)**: 4431-4439, 2006.
- HONG, D., YE, F., CHEIN, H., LU, W., CHENG, Q., HU, Y., XIE, X. Distribution of human Papillomavirus genotypes in the patients with cervical carcinoma and its precursors in Zhejiang Province, China. **International Journal of Gynecological Cancer**, **18(1)**: 104-109, 2007.

HOWLEY, P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses.

Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 117:

113-126, 2006.

<http://www.merckfrosst.ca/mfcl/en/corporate/index.html>

HUGHES, F.J. and ROMANOS, M.A. E1 protein of human papillomavirus is DNA

helicase/ATPase. **Nucleic Acids Research, 21:** 5817-5823, 1993.

IGANSI, C.N. **Prevalência da infecção pelo *Papillomavirus humano* e *Clamydia trachomatis* e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres**

assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia)

- Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, 2005, 26p; 52p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus

Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,

2005, disponível em <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.

ISHI, K., SUZUKI, F., SAITO, A., KUBOTA, T. Prevalence of human papillomavirus,

chlamydia trachomatis, and neisseria gonorrhoeae in commercial sex workers in

Japan. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 8:** 235-239, 2000.

JUNG, W.W., CHUN, T., SUL, D., HWANG, K.W., KANG, H.S., LEE, D.J., HAN,

I.K. Strategies against human Papillomavirus infections and cervical cancer. **The**

Journal of Microbiology, 42(4): 255-266, 2004.

KAPLAN-MYRTH, N., DOLLIN, J. Cervical cancer awareness and HPV prevention in

Canadá. **Canadian Family Physician, 53:** 693-697, 2007.

KATAJA, V., SYRJÄNEN, S., YLISKOSKI, M., HIPELLÄINEN, M., VÄYRYNEN,

M., SAARIKOSKI, S., MÄNTJÄRVI, R., JOKELA, V., SALONEN, J.T.,

SYRJÄNEN, K. Risk factors associated with cervical human Papillomavirus

- infections: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, **138**: 735–745, 1993.
- KENNETH, I. B. *Papillomavirinae*: their virus and their replication. In: **Fundamental Virology**. P.M Howley, D. M. Knipe & B.N Fields (eds). Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, 1996, p. 947- 978.
- KIM D., GAMBHIRA R., KARANAM B., MONIE A., HUNG C. F., RODEN R. E WU T. C. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. **Vaccine**, **26(3)**: 351–360, 2008.
- KOUTSKY, L. Epidemiology of genital human Papillomavirus infection. **The American Journal of Medicine**, **102 (5A)**: 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. **Neglected Tropical Diseases**, **3 (11)**: e3743, 2008.
- LEVI, J.E, KLETER, B., QUINT, W.G.V., FINK, M.C.S., CANTO, C.L.M., MATSUBARA, R., LINHARES, I., SEGURADO, S., VANDERBORGHT, B., NETO, J.E., VAN DOORN, L-J. High prevalence of human Papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, **40(9)**: 3341–3345, 2002.
- LONGWORTH MS, LAIMINS L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **68(2)**: 362–372, 2004.

- LOPES, F., LATORRE, M.R.D.O., PIGNATARE, A.C.C., BUCHALLA, C.M. Prevalência de HIV, papilomavírus humano e sífilis na penitenciária feminina da capital, São Paulo, 1997-1998. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17(6):1473-1480, 2001.**
- LOWY, D.R., SCHILLER, J.T. Prophylactic human Papillomavirus vaccines. **The Journal of Clinical Investigation, 116 (5): 1167-1173, 2006.**
- MANOS, M.M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells, 7: 209-214, 1989.**
- MANSI, J.A. Vaccination against human Papillomavirus. **Canadian Medical Association of Journal, 177(12): 1524, 2007.**
- MARTINS, M.C.L., BÔER, C.G., SVIDZINSKI, T.I.E., DONIDA, L.G., MARTINS, P.F.A., BOSCOLI, F.N, CONSOLARO, M.E.L. Avaliação do método de Papanicolaou para triagem de algumas infecções cérvico-vaginais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas, 39(3): 217-221, 2007.**
- McBRIDE, A.A., ROMANCZUK, H., HOWLEI, P.M. The papillomavirus E2 regulatory proteins. **Journal of Biological Chemistry, 266: 18411-18414, 1991.**
- MCMILLIAN, N. A., E. PAYNE, I. H. FRAZER, AND M. EVANDER. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. **Virology, 261: 271-279, 1999.**
- MCMURRAY, H.R., NGUYEN, D., WESTBROOK., T.F., MCCANCE, D.J. Biology of human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology, 82: 15-33, 2001.**
- MINKOFF H, FELDMAN J, DE HOVITZ J, LANDESMAN S, BURK R. A. Longitudinal study of human Papillomavirus carriage in human immunodeficiency

- virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected women. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, **178**: 982–986, 1998.
- MOSCICKI, A.B. HPV infections in adolescents. **Diseases Markers**, **23**: 229-234, 2007.
- MÜNGER, K., BALDWIN, A., EDWARDS, K.M, HAIA-KAWA, H., NGUYEN, C.L., OWENS, M., GRACE, M., HUH, K. Mechanisms of human Papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, **78(21)**: 11451-11460, 2004.
- MÜNGER, K., BASILE, JR., DUENSING, S., EICHTEN, A., GONZALEZ, S.L, GRACE, M., ZACNY, V.L. Biological activities and molecular targets of the human Papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, **20**: 7888-7898, 2001.
- MUÑOZ, N., BOSCH, F.X., DE SANJOSÉ, S. HERRERO, R., CASTELLSAGUÉ, X., SHAH, K.V., SNIJIDERS, P.J.F., MEIJER, C.J.L.M. International agency for research on cancer multicenter cervical cancer study group. Epidemiologic classification of human Papillomavirus type associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, **348**: 518-527, 2003.
- MUNRO, M.G. Papillomaviral infectious of the female genital tract. **Canadian Family Physician**, **38**: 2613-2741, 1992.
- NARISAWA-SAITO, M., KYIONO, T. Basic mechanisms of high-risk human-Papillomavirus induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, **98(10)**: 1505-1511, 2007.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Blast Assembly Genomes**, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- NG'ANDWE, C., LOWE, J.J., RICHARDS, P.J., HAUSE, L., WOOD, C., ANGELETTI, P.C. The distribution of sexually transmitted human papillomaviruses

- in HIV positive and negative patients in Zambia, África. **BMC Infections Diseases**, **7**: 77, 2007.
- NORONHA,V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32 (3)**: 235-240, 1999.
- NOVAES, L.C.G., GARBI-NOVAES, M.R.C., SIMÕES-BARBOSA, A. Diagnosis of human papillomatosis by Polymerase Chain Reaction in cases of divergence between results of Hybrid Capture and Papanicolaou Cytology. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **10(3)**: 169-172, 2006.
- OLIVEIRA, L. H. S., RODRIGUES, B. V., M., LOPES, A. P. T. A., FERNANDEZ, A. P., E CAVALCANTI, S.M.B. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. **Sao Paulo Medical Journal**, **121(2)**:67-71, 2003.
- PANNIER-STOCKMAN, C., SEGARD, C., BENNAMAR, S., GONDRY, J., BOULANGER, J.C., SEVESTRE, H., CASTELAIN, S., E DUVERLIE, G. Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. **Journal of Clinical Virology**, **42 (4)**: 353-360, 2008.
- PEH, W.L., MIDDLETON, K., CHRISTENSEN, N., NICHOLLS, P., EGAWA, K., SOTLAR., K., BRANDSMA, J., PERCIVAL, A., LEWIS, J., LIU, W.J., DOORBAR, J. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. **Journal of Virology**, **76(20)**: 10401-10416, 2002.

- PEREIRA, C.R.N., ROSA, M.L.G., VASCONCELOS, G.A.L.B.M., FARIA, P.C.P., CAVALCANTI, S.M.B., OLIVEIRA, L.H.S. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Gynecological Cancer**, **17**: 651–660, 2007.
- PETT, M.R., HERDMAN, M.T., PALMER, R.D., YEO, G.S.H., SHIVJI, M.K., STANLEY, M.A., COLEMAN, N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **103(10)**: 3822-3827, 2006.
- PEYTON, C.L., GRAVITT, P.E., HUNT, W.C., HUNDLEY, R.S., ZHAO, M., APPLE, R.J., WHEELER, C.M. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **The Journal of Infectious Diseases**, **183**: 1554-1564, 2001.
- PFÍSTER, H. Human papillomavirus and skin cancer. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, **31**: 52-56, 2003.
- RÁCZ, M.L. Papilomavírus. In: **Microbiologia**. L.R. Trabulsi & F. Althertuhm (eds). Atheneu – São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2004, p. 627-629.
- RAMA, C.H., ROTELI-MARTINS, C.M., DERCHAIN, S.F.M., LONGATTO-FILHO, A., GONTIJO, R.C., SARIAN, L.O.Z., SYRJÄNEN, K., ALDRIGHI, J.M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, **42(1)**: 123:30, 2008.

- RAMOZ, N., RUEDA, L.A., BOUADJAR, B., MONTOYA, L.S., ORTH G., FAVRE, M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciform. **Nature Genetics**, **32**: 579-581, 2002.
- ROBERTS, S., ASHMOLE, I., GIBSON, L.J., ROOKES, S.M., BARTON, G.J., GALLIMORE, P.H. Mutational analysis of human papillomavirus E4 protein: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. **Journal of Virology**, **68**: 6432-6445, 1994.
- RODEN, R. B., LOWY D. R., SCHILLER, J. T. Papillomavirus is resistant to desiccation. **The Journal of Infectious Diseases**, **176**:1076–1079, 1997.
- ROTELI-MARTINS,C.M., LONGATTO-FILHO, A., HAMMES, L.S., DERCHAM, S.F.M., NALD, P., MATOS, J.C., ETUNGER, D., SARIAN, L., GONTIJO, R.C., MAEDA, M.Y.S., SYRJÄNEN, K,J. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. **Revista Brasileira de Obstetrícia e Ginecologia**, **29**(11): 580-587, 2007.
- RUFFIN IV, M.T., BAILEY, J.M, ROULSTON, D., LEE, D.R, TURCKER, R.A., SWAN, D.C, UNGER, E.R. Human papillomavirus in amniotic fluid. **BMC Pregnancy and Childbirth**, **6**: 28, 2006.
- SANCLEMENTE, G. GILL, D.K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **European Academy of Dermatology and Venereology**, **16**: 231-240, 2002.

- SCHEURER, M.E., TORTOLERO-LUNA, G., ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, **15**: 727-746, 2005.
- SCOTT, M., NAKAGAWA, M., MOSCICKI, A.N. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **8(2)**: 209-220, 2001.
- SELLORS, J. W., MAHONY, J. B., KACZOROWSKI, J., LYTWYN, A., BANGURA, H., CHONG, S., LORINCZ, A., DALBY, D. M., JANJUSEVIC, V., KELLER, J. L. Prevalence and predictors of human papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. **Canadian Medical Association Journal**, **163 (5)**: 503-508, 2000.
- SELLORS, J.W., KARWALAJTYS, T.L., KACZOROWSKY, J., MAHONY, J.B., LYTWYN, A., CHONG, S., SPARROW, J., LORINCZI, A. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canadian Medical Association of Journal**, **168 (4)**: 421-425, 2003.
- SHERMAN L, JACKMAN A, ITZHAKI H, STOPPLER MC, KOVAL D, SCHLEGEL R. Inhibition of serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6 oncoprotein: role of p53 inactivation. **Virology**, **237**: 296-306, 1997.
- SHIMADA, T., MIYASHITA, S., MIURA, S., KAKAYAMA, D., MIURA, K., FUKUDA, M., MASUZAKI, H. Genital human papillomavirus infection in mentally-institutionalized virgins. **Gynecologic Oncology**, **106(3)**: 488-489, 2007.
- SHIRASAWA, H., TOMITA, Y., SEKUYA, S., TAKAMISAWA, H., SIMIZU, B. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in

- cell lines derived from cervical carcinomas. **Journal of General Virology**, **68**: 583-591, 1987.
- SIRIAUNKGUL, S., SWUIWAT, S., SETTAKORN, J., KHUNAMORNPOONG, S., TUNGSINMUNKONG, K., BOONTHUM, A., CHAISUKSUNT, V., LEKAWANVIJIT, S., SRISOMBOON, J., THORNER, P.S. HPV genotyping in cervical cancer in Northern Thailand Adapting the linear array HPV assay for use on paraffin-embedded tissue. **Gynecologic Oncology**, **108(3)**: 555-560, 2008.
- SMITS, P.H.M., BAKKER, R., JONGE, E., MULDER, J.W., MEENHORST, P.L., KLETER, B., VAN DOORN, L.J., QUINT, W.G.V. High Prevalence of human papillomavirus infections in urine Samples from human immunodeficiency virus-Infected Men. **Journal of Clinical Microbiology**, **43(12)**: 5936-5939, 2005.
- SOARES, V.L., MESQUITA, A.M.T., CAVALCANTE, F.G., SILVA, Z.P., HORA, V., DIEDRICH, T., SILVA, P.C., MELO, P.G. DACAL, A.R.C., CARVALHO, E.M.F., FELDMEEIRE, H. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Tropical Medicine and International Health**, **8(7)**: 595-603, 2003.
- SONNEX, C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. **Journal of Clinical Pathology**, **51**: 643-648, 1998.
- STOLER, M.H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, **127**: 935-939, 2003.
- THE FUTURE II STUDY GROUP. Quadrivalent vaccine against human Papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. **The New England Journal of Medicine**, **356(19)**:1915-1927, 2007.

- TIN, S. K., LEE, L. Y., THUMBOO, J., KOH, D. R., FONG, K. Y. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human Mannose Binding Lectin (MBL-2) gene. **Journal of Immunological Methods**, **303**: 148-151, 2005.
- TUNGTEAKKHUN, S.S., DUERKSEN-HUGHES, P.J. Cellular binding partners of the human Papillomavirus E6 protein. **Archives of Virology**, **153**: 397-408, 2008.
- TUREK, L.P. The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. **Advances in Virus Research**, **44**: 305-356, 1994.
- TYRING, S.K. Human Papillomavirus infection: epidemiology, pathogenesis and host immune response. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **43 (1)**: S18-S26, 2000.
- VAN TINE, B.A., KAPPES, J.C., BANERJEE, N.S., KNOPS, J., LAI, L., STEENBERGEN, R.D.M., MEIJER, C.J.M., SNIJDERS, P.J.F., CHATIS, P., BROKER, T.R., MOEN JR, P.T., CHOW, L. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. **Journal of Virology**, **78(20)**: 11172–11186, 2004.
- VERTERAMO, R., PIERANGELI, A., MANCINI, E., CALZOLARI, E., BUCCI, M., OSBORN, J., NICOSIA, R., CHIARINI, F., ANTONELLI, G., DEGENER, A. Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynecological outpatients. **Infectious Diseases**, **9**:16, 2009.
- VILLA, L. L.; COSTA, R. L. R.; PETTA, C. A.; ANDRADE, R. P.; PAAVONEN, J.; IVERSEN, O. E.; OLSSON, S. E.; HØYE, J.; STEINWALL, M.; RIIS-JOHANNESSEN, G.; ANDERSSON-ELLSTROM, A.; ELFGREN, K.; VON KROGH, G.; LEHTINEN, M.; MALM, C.; TAMMS, G.M.; GIACOLETTI, K.;

- LUPINACCI, L.; RAILKAR, R.; TADDEO, F. J.; BRYAN, J. ; ESSER, M. T.; SINGS, H. L.; SAAH, A. J. E BARR, E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human Papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. **British Journal of Cancer**, **95**: 1459 – 1466, 2006.
- VON ZUBEN, V.M., DERCHAIN, S. F., SARIAN, L. O., WESTIN, M. C., THULER, L. C. S., ZEFERINO, L. C. The impact of a community intervention to improve cervical cancer screening uptake in the Amazon region of Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**: **125(1)**:42-5, 2007.
- WATT, A., GARWOOD, D., JACKSON, M., YOUNGER, N., RAGIN, C., SMIKLE, M., FLETCHER, H., MCFARLANE-ANDERSON, M. High-risk and multiple human Papillomavirus (HPV) infections in cancer-free Jamaican women. **Infectious Agents and Cancer**, **4 (1)**: S11, 2009.
- WATT, F.M . Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. **Philosophical Transactions the Royal Society Biological Sciences**, **353**: 831-837, 1998.
- WERNES BA, LEVINE AJ, HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, **248 (4951)**:76–79, 1990.
- WILSON, V.G., WEST, M., WOYTEK K., RANGASAMY, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function and features. **Virus Genes**, **24**: 275-290, 2002.
- YOU, J., CROYLE, J.L., NISHIMURA, A., KEIKO, O., HOWLEY, P.M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein: with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, **117**: 349-360, 2004.

- YUAN, H., ESTES, P.A., CHEN, Y., NEWSOME, J., OLCESE, V. A., GARCEA, R. L., e SCHLEGEL, R. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against Papillomavirus infection. **Journal of Virology**, **75(17)**: 7848–7853, 2001.
- ZAMPIROLO, J. A., MERLIN, J. C., MENEZES, M. E., Prevalence of HPV of low and high-risk for the technique of molecular biology (Hybrid captures II®) in Santa Catarina. **Role Based Access Control**, **39(4)**: 265-268, 2007.
- ZHENG, Z.M., BAKER, C.C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, **11**: 2286-2302, 2006.
- ZHOU, J., GISSMANN, L., ZENTGRAF, H., MÜLLER, H., PICKEN, M., MÜLER, M. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virons. **Virology**, **214**: 167-176, 1995.
- ZIELINSKI, G.D., SNIJDERS, P.J., ROZENDAAL, L DAALMEJER, N., RISSE, E.K.J., VOORHORST, F.J., JIWA, N.M., VAN DER LINDEN, H.C., DE SHIPPER, F.A., RUNSINK, A.P., MEIJER, C.J.L.M. The presence of high-risk HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high-risk HPV as the main causative agent for adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma of the cervix. **The Journal of Pathology**, **201**: 535-543, 2003.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS
 DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estou sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre **PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES RASTREADAS PARA O CÂNCER DE COLO DO ÚTERO, NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ**, que será desenvolvida no Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:

- O título do projeto é Prevalência da Infecção pelo HPV em mulheres atendidas pelo Laboratório de Citopatologia da UFPA, na cidade de Belém, Pará.
- O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Luís Fernando Almeida Machado, Biomédico, Professor Adjunto da Universidade Federal do Pará.
- O objetivo da pesquisa é descrever a ocorrência de tipos de HPV de alto risco em mulheres na cidade de Belém, Pará.
- Essa pesquisa não oferece riscos biológicos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de secreção cervical será coletada e, posteriormente estocada a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA para pesquisas futuras, caso seja permitido pelo participante.
- Toda nova pesquisa com material estocado será submetida à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.
- Serão utilizados materiais esterilizados descartáveis, como “bico-de-pato” e escovas endocervicais, não oferecendo risco de contaminação para a pessoa. No entanto, algum desconforto pode ocorrer.
- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá de deixar a pesquisa no momento em que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
- Esta pesquisa não oferece qualquer possibilidade de ajuda financeira aos voluntários que participarem do estudo.
- O resultado deste trabalho será convertido em benefício para todos os que participarem através da realização dos testes e auxílios dos órgãos competentes caso necessário.
- A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Prof. Dr. Luís Fernando Almeida Machado

Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Laboratório de Virologia, Rua Augusto Corrêa nº1 – Guamá, Fone/Fax: (91) 3201-7587.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame, permitindo que o mesmo seja armazenado para pesquisas futuras.
 Belém, ____/____/____.

Prontuário: _____

Assinatura do participante
 Protocolo: _____

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS
 LABORATÓRIO DE CITOPATOLOGIA

LÂMINA Nº

DATA DA COLETA:

QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

NOME:

IDADE:

ENDEREÇO

TELEFONE:

ESTADO CIVIL:

PROFISSÃO/OCUPAÇÃO:

ESCOLARIDADE: () ANALFABETA () 1º GRAU COMPLETO

() 1º GRAU INCOMPLETO () 2º GRAU COMPLETO

() 2º GRAU INCOMPLETO () 3º GRAU COMPLETO

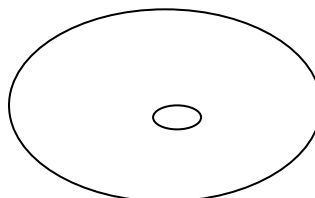
FUMANTE: () SIM () NÃO

ASPECTOS DO COLO ÚTERO

() HIPEREMiado

() FERIDO

() ECTOPIA



OUTROS: _____

DADOS DA ANAMNESE

MENARCA: _____ ANOS D.U.M. ___/___/___ ÍNICIO DA VIDA SEXUAL: _____ ANOS

TEM VIDA SEXUALMENTE ATIVA: () SIM () NÃO HÁ QUANTO TEMPO: _____

Nº DE PARCEIROS NO ÚLTIMO ANO:

Nº DE FILHOS: ___ Nº DE PARTOS NORMAIS: ___ ABORTO: ___ ESTÁ GRÁVIDA: ___

USO DE ANTICONCEPCIONAL: () SIM () NÃO () JÁ USOU PERÍODO DE USO: ___

USA REMÉDIO PARA TRATAR A MENOPAUSA: () SIM () NÃO

DIABÉTICO: () SIM () NÃO RADIOTERAPIA: () SIM () NÃO QUANDO: ___

ÓRGÃO: ___

FEZ ALGUMA CIRURGIA: () SIM () NÃO ÓRGÃO: _____ () CAUTERIZAÇÃO () BIÓPSIA

JÁ FEZ PREVENTIVO: () SIM () NÃO EM QUE ANO FEZ O ÚLTIMO: _____ ONDE: _____

TOMA REMÉDIO PRA VERME: () SIM () NÃO ÚLTIMA VEZ QUE TOMOU: _____

QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO (continuação)

COMPORTAMENTO SEXUAL

PARCEIROS: HETEROSSEXUAL HOMOSSEXUAL BISSEXUAL
 USUÁRIO DE DROGAS NÃO EDOVENOSAS
 USUÁRIO DE DROGAS ENDOVENOSAS PORTADOR DE HIV
 SEXO COM PARCEIROS DE OUTRO ESTADO; SIM NÃO
 SEXO COM PARCEIROS DE OUTRO PAÍS: SIM NÃO
 USA PRESERVATIVO: SIM NÃO USA DIU: SIM NÃO
 PRÁTICA DE SEXO ANAL: SIM NÃO

SINTOMATOLOGIA

SECREÇÃO VAGINAL: SIM NÃO INTENSIDADE: SIM NÃO
 COR: AMARELO OURO AMARELO CLARO ACINZENTADO BRANCO
 LEITOSO
 ODOR: SIM NÃO
 VERRUGAS GENITAIS: SIM NÃO
 ARDÊNCIA AO URINAR: SIM NÃO
 PRURIDO/COCEIRA: SIM NÃO
 DOR NO BAIXO VENTRE DURANTE AS RELAÇÕES SEXUAIS SIM NÃO
 SANGRAMENTO: SIM NÃO
 PARCEIROS COM SINTOMAS: SIM NÃO