



FACULDADE DE EDUCAÇÃO E MEIO AMBIENTE

ELOIZE FERNANDA OLIVERO

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV):
ASPECTOS GERAIS**

ARIQUEMES – RO

2013

Eloize Fernanda Olivero

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV):
ASPECTOS GERAIS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel.

Orientador (a): Prof^a. Ms. Fabia Maria Pereira de Sá

Ariquemes-RO

2013

Eloize Fernanda Olivero

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV):
ASPECTOS GERAIS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel.

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador (a): Prof^a. Ms. Fábila Maria Pereira de Sá
Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA

Prof. Ms. Nelson Pereira da Silva Júnior
Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA

Prof^a. Esp. Rosineide Vieira Gois
Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA

Ariquemes, 08 de julho de 2013

A Deus, por ter mantido a minha vida, e concedido a realização deste sonho.

A minha mãe, Susely Cassia, razão da minha existência.

A meu pai, pelo exemplo de força de vontade.

A meu irmão, por alegrar os meus dias.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois foi a tua maravilhosa mão que encontrei estendida todos os dias, quando realmente precisei de uma força maior. Foram os teus olhos que me iluminaram, quando queria desistir, tuas palavras que me orientaram, mostrando o caminho a ser percorrido, quando me sentia perdida!

À professora Fábiana, pela dedicação em todas as etapas deste trabalho.

À minha família, pela confiança e motivação, por sempre estar ao meu lado confiando e me confortando em todos os momentos.

A todos os amigos que fiz ao longo desses anos, amigos de sala, amigos de estrada, obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos professores, que com empenho e dedicação estiveram comigo nesta jornada.

A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.

Horácio

RESUMO

Em meados de 1980, as infecções genitais causadas pelo Papilomavírus Humano (HPV) começaram a chamar atenção de cientistas e pesquisadores, devido ao elevado número de casos, bem como a associação deste agente viral ao câncer do colo de útero. O objetivo deste trabalho foi descrever as principais características das infecções cervicais por Papilomavírus Humano (HPV), com ênfase nos métodos diagnósticos, o que foi conseguido por meio de revisão de literatura. A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) se constitui em um grave problema de saúde pública, afetando milhões de mulheres no mundo em idade sexualmente ativa. Esta infecção, principalmente com tipos de alto risco oncogênico, está associada ao desenvolvimento de câncer do colo de útero. Em vista disso, vários métodos têm sido utilizados para o seu rastreamento, como o exame de Papanicolaou e, mais recentemente, os métodos de biologia molecular. Além disso, métodos profiláticos, por meio de vacinas, também foram desenvolvidos como meio de prevenir esta infecção.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, câncer do colo do útero, técnicas de biologia molecular, Reação em Cadeia da Polimerase, Neoplasia intraepitelial Cervical.

ABSTRACT

In the mid 1980s, genital infections caused by Human Papillomavirus (HPV) began to draw the attention of scientists and researchers, due to the high number of cases, as well as the association of this viral agent to cancer of the cervix. The aim of this study was to describe the main characteristics of cervical infection by human papillomavirus (HPV), with emphasis on diagnostic methods, which was achieved through literature review. Infection with human papillomavirus (HPV) constitutes a serious public health problem, affecting millions of women worldwide aged sexually active. This infection, primarily with high-risk HPV types, is associated with development of cancer of the cervix. In view of this, various methods have been used for their screening, such as Pap smears and, more recently, methods of molecular biology. Furthermore, prophylactic, using vaccines have also been developed as a means of preventing this infection.

Keywords: Human papillomavirus, cervical cancer, molecular biology techniques, Polymerase Chain Reaction, Cervical intraepithelial neoplasia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia eletrônica mostrando as partículas de papilomavirus.....	15
Figura 2: Organização genômica do HPV.....	17
Figura 3: Estágios do ciclo do HPV.....	19
Figura 4: Evolução das lesões de colo uterino.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPV	Papilomavírus humano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
HND	História natural da doença
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ASCUS	Atipia de célula escamosa de significado indeterminado
HC	Captura híbrida
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RLU	Unidade Relativa de Luz
PCR-TR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 METODOLOGIA	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	15
4.1.1 Classificação e Morfologia do HPV	15
4.1.2 Organização Genômica do HPV	16
4.1.3 História Natural do HPV	18
4.1.4 Epidemiologia e fatores de risco	20
4.1.5 Vacinas contra HPV	21
4.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV	22
4.2.1 Exame Papanicolaou	23
4.2.2 Biologia molecular	24
4.2.3 Hibridização <i>in situ</i>	25
4.2.4 Captura híbrida II	26
4.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
REFERÊNCIAS	29

INTRODUÇÃO

Em meados de 1980, as infecções genitais causadas pelo Papilomavírus Humano (HPV) começaram a chamar atenção de cientistas e pesquisadores, devido ao elevado número de casos, embora estas infecções sejam relatadas desde a antiguidade. (CASTLE et al., 2002).

Os papilomavírus (PV) pertencem à família *Papillomaviridae* e infectam muitas espécies de vertebrados, sendo altamente espécie-específicos e similares na estrutura física e organizacional. (SASAGUAWA et al., 2001). São vírus de formato icosaédrico, não envelopados, com genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular de uma fita dupla e contém de seis a oito genes, que podem se expressar precocemente (região "E" ou *Early*) e dois que se expressam tardiamente (região "L" ou *Late*). (SCHILLER et al., 2008).

A forma mais comum de transmissão são as vias sexuais, afetando pessoas de ambos os sexos. (SANJOSÉ et al., 2007). Segundo Hoque et al. (2008) é considerada a doença sexualmente transmissível mais comum em mulheres de todo o mundo, com prevalência de 10,4%, estando presente de modo assintomático e em 2 a 44 % da população feminina. Ainda se calcula que esteja presente em cerca de 50 a 80 % das mulheres sexualmente ativas, em algum momento de suas vidas.

O ciclo de vida do HPV tem como ponto inicial a infecção pelo vírus nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico, que ocorre devido à microerosões ou traumatismos na pele ou mucosas. Assim, ao ponto em que se subdividem, as células se dirigem à superfície e se diferenciam ao se dividirem, disseminando o DNA viral. Estima-se que 70 % das infecções pelo vírus do HPV sejam transitórias e desaparecem em um período médio de um ano. (HO, 1998).

O HPV é considerado coadjuvante no desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e câncer cervical, porém, dentre os mais de 100 tipos de HPV sequenciados, nem todos são oncogênicos. Contudo, em 99,7 % dos casos de cânceres cervicais são relatadas a presença de um ou mais dos seguintes tipos de HPV, que são ditos de alto risco oncogênicos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. (VINCE et al., 2002). É importante ressaltar que métodos de rastreamento e detecção foram incluídos em programas de saúde (CASTLE et al.,

2002), o que gerou diminuição na incidência dos casos de neoplasias. (CARVALHO, 2003).

O diagnóstico da infecção por HPV pode ser realizado por meio da histopatologia das lesões ou pela constatação do DNA do vírus nas células. (MOLIJIN et al., 2005). Por conseguinte, o principal método histológico utilizado é o Papanicolau, que se baseia na observação e interpretação subjetiva das alterações estruturais da célula. (FAIT et al., 2000). Este método se apresenta como um método acessível e rápido (HILLMAN et al., 1993), todavia o exame colposcópico apresenta elevada porcentagem de resultados que indicam falso-negativo, o que pode ser relacionado, por exemplo, com a coleta inadequada do material cervical. (LORINCZATI, 1990).

Para a detecção de HPV, técnicas de biologia molecular têm sido cada vez mais utilizadas (FARIA et al, 2008), como por exemplo, técnicas de hibridização das quais podemos citar a *Southern blot*, *Dot blote*, *reverse blot*, Hibridização *in situ*, captura híbrida não radioativa e também a reação em cadeia da polimerase (PCR). (LETO et al., 2011). Estes métodos apresentam especificidade e sensibilidade analítica variada, as quais dependem da qualidade da amostra e dos reagentes utilizados, conforme as características de cada ensaio. (IFTNER, 2003).

Assim, é importante conhecer as principais características desta importante infecção, a fim de adquirir condutas profissionais mais adequadas no exercício da profissão, de forma a diminuir os casos de câncer do colo do útero, oriundos, na grande maioria dos casos, de infecções por HPV

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as principais características das infecções cervicais por Papilomavírus Humano (HPV), com ênfase nos métodos diagnósticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comentar as principais características biológicas do HPV;
- Discorrer sobre a história natural da infecção por HPV;
- Pontuar os métodos profiláticos da infecção por HPV;
- Discorrer sobre os métodos de diagnóstico da infecção por HPV, com ênfase naqueles que empregam biologia molecular.

3 METODOLOGIA

A metodologia empregada foi do tipo revisão de literatura, de caráter exploratório e relativo. A estratégia de pesquisa se deu por meio de artigos científicos recuperados de bases de dados *on line*, como: *U.S. National Library of Medicine* (PubMed), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), bem como teses e monografias. Os descritores utilizados na pesquisa foram: Papilomavírus humano, câncer do colo do útero, técnicas de biologia molecular, Reação em Cadeia da Polimerase, Neoplasia intraepitelial Cervical.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

4.1.1 Classificação e Morfologia

Os Papilomavírus infectam muitas espécies de vertebrados, como exemplo os humanos, bovinos e felídeos, entretanto são espécie-específicos. (CAMPOS et al., 2002).

Os papilomavírus e os poliomavírus foram primeiramente agrupados em uma mesma família, a *Papovaviridae*, devido à semelhança presente entre esses vírus. (KENNETH, 1996). O Papilomavírus Humano (Figura 1) trata-se de um vírus que pertence à família *Papillomaviridae*, com 55 nm de tamanho, sem envelope e com material genético composto de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular de fita dupla, com cerca de 8.000 pares de bases nucleotídicas (HILLEMANN et al., 2008) associadas a histonas celulares H2a, H2b, H3 e H4, formando um complexo similar ao da cromatina. (BERNARD, 2005).

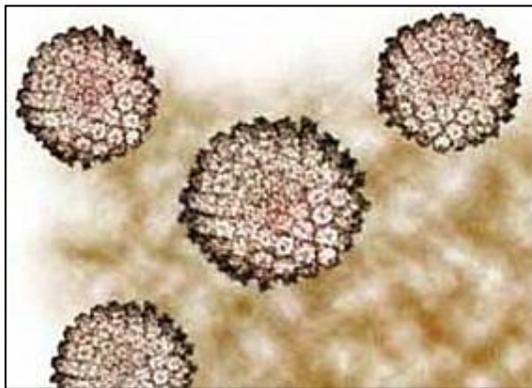


Figura 1 – Micrografia eletrônica mostrando partículas de HPV

Fonte: Sttanard (1995)

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2006), mais de 100 genótipos do HPV já foram isolados e tiveram seu DNA sequenciado.

Com base na ordem do genoma viral, foi possível criar uma classificação na qual se tem como base os componentes genômicos, utilizando-se a nomenclatura

tradicional como tipo, subtipo e variante. Nesta classificação é utilizada a região mais conservada do genoma viral, ou seja, a do gene L1. Variações nesta sequência permitem a distinção dos tipos. (SHROYER, 2008). Atualmente, os papilomavírus humano e animal compõem 16 gêneros. (ICTV, 2006). Os gêneros *Alphapapillomavirus* e *Betapapillomavirus* são encontrados em aproximadamente, 90 % dos HPV caracterizados. (PFISTER, 2003),

O gênero *Alphapapillomavirus* contém a maioria dos tipos de HPV (RAMOZ et al., 2002) que podem levar ao aparecimento de lesões benignas e malignas, já os *Betapapillomavirus* são distintivamente ligados a infecções cutâneas assintomáticas em seres humanos, à exceção de indivíduos imunocomprometidos, os quais desenvolvem a epidermodisplasia verruciforme (EV) e em pacientes com câncer de pele não-melanoma. (VILLIERSET et al., 2004). Em seguida, pode-se mencionar os gêneros *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*. (ICTV, 2006).

4.1.2 Organização Genômica do HPV

Devido à ausência de envelope, o vírus é relativamente estável e resistente à dessecação, mantendo-se viável no meio extracelular por até uma semana. (DOORBAR, 2005).

O genoma é dividido em regiões gênicas (Figura 2) denominadas sequências abertas de leitura (ORF), do inglês *open reading frames*, que estão situadas na mesma fita de DNA, podendo ser funcionalmente separadas em três regiões principais. A primeira é uma região regulatória, de 400 a 1.000 pares de bases, que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6. É nesta região pouco íntegra que estão localizados os genes que regulam e dão início a replicação do vírus. A segunda região é denominada de região precoce ou “E” (*early*), formada pelos ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão ligados aos processos de replicação viral, controle da transcrição e na oncogênese. E por último, a terceira região chamada tardia ou “L” (*late*), que é responsável por codificar as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral. (TYRINGSK et al., 2000). O Quadro 1 mostra as proteínas codificadas pelas ORF dos Papilomavírus e suas funções.

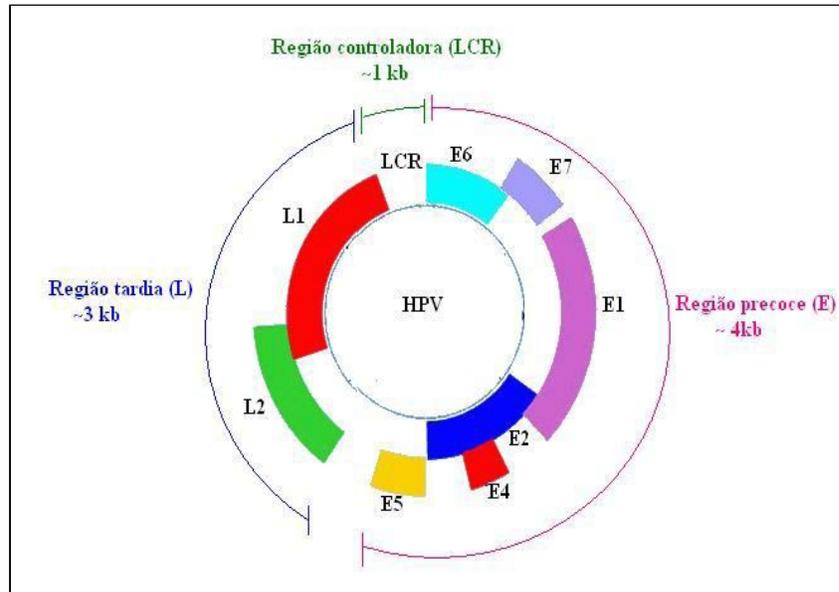


Figura 2 – Organização genômica do HPV

Fonte: Adaptado de Tyring (2000)

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

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

Fonte: Howley (2006)

Pode-se dizer que os genes E6 e E7 são responsáveis por codificar proteínas que estão relacionadas à malignidade, visto que estas imortalizam os queratinócitos. (SYRJANEN, 1999).

4.1.3 História Natural do HPV

A História Natural da Doença (HND) compreende as interações entre o agente etiológico, o hospedeiro e o ambiente, que, quando estão em desarmonia, apresentam como resultado a patologia. (GOLDBAUM, 2003).

A história da infecção genital pelo HPV evidencia a presença de meios onde o hospedeiro se defende do vírus (STANLEY, 2001), consideradas comuns em mulheres sexualmente ativas e curando-se espontaneamente na maioria dos casos, (BOSCH et al., 2002). Uma pequena parcela de pessoas infectadas tem o desenvolvimento da doença. Quando infectadas por HPV de alto risco, as lesões podem evoluir para lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e, algumas delas, progredem para carcinoma invasor. (CLIFFORD et al., 2006).

Para que haja a infecção é necessário a perda da integridade do epitélio, através de traumatismos ou microerosões nas mucosas ou na pele. A infecção tem princípio nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico. Na medida em que se dividem, elas migram para a superfície se diferenciando. Ao se dividirem, as células portadoras do vírus do HPV liberam o DNA viral entre as células filhas. Uma delas se diferencia ocorrendo a maturação, e a outra continua indiferenciada na camada basal, atuando como reserva de DNA viral. (DOORBAR, 2005).

As proteínas E1 e E2 atuam mantendo o DNA do vírus na forma episossomal auxiliando na correta separação do genoma viral durante a divisão das células. (KANODIA et al., 2007).

Em seguida, nas células das camadas média ou superficial, os vírus replicam seu genoma requerendo a expressão dos genes de E4 e E5, com posterior junção de E2 e expressão do gene E1, o qual promove a abertura da hélice de DNA e os acomodam em partículas, produzindo vírions infectantes, deste modo ocorre a replicação e, por conseguinte, a instituição do capsídeo na parte superior do epitélio. (DOORBAR, 2005).

O término da síntese viral ocorre nas camadas superiores do epitélio, com a codificação de L1 e L2, que são proteínas estruturais, com liberação das partículas virais quando as células atingem a superfície epitelial. (DOORBAR, 2005). A Figura 3 ilustra as principais etapas do ciclo do HPV.

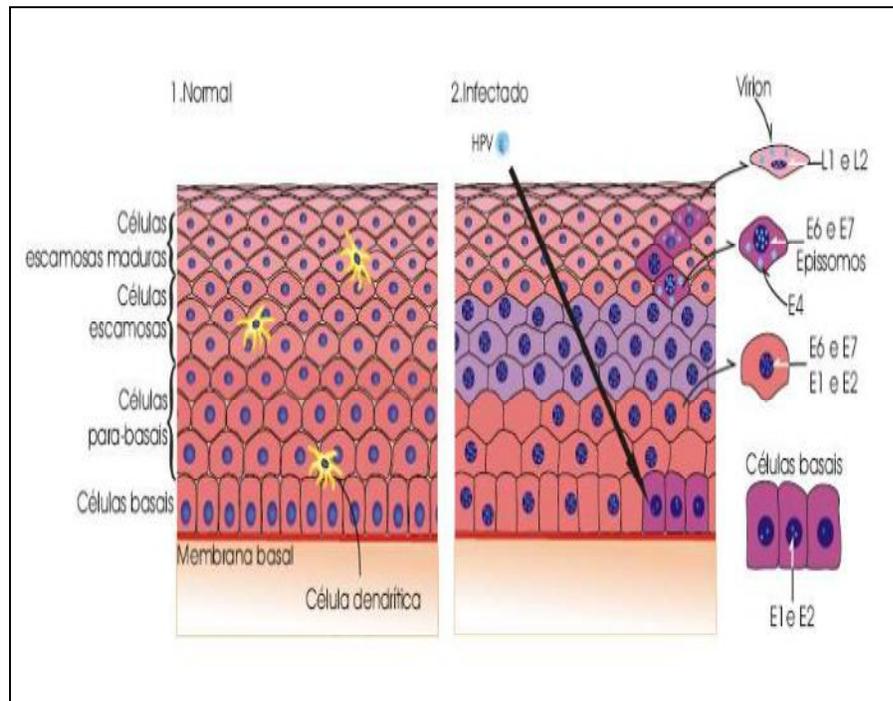


Figura 3 – Estágios do ciclo do HPV.

Fonte: Munoz et al. (2006)

Segundo Kanodia et al. (2007), se a infecção for persistente, disfunções na replicação podem levar à interação do DNA do vírus com DNA celular do hospedeiro, com a linearização dos genes E1 e L1, seguida da inativação dos genes E2, responsável por regular as atividades de E6 e E7, o que ocasiona a expressão exagerada destes genes, imortalizando as células. (STOLER et al., 1999).

Estes genes, com potencial oncogênico, complexam-se respectivamente com as proteínas celulares denominadas p53 e pRb, levando à inativação e conseqüentemente ao descontrole do ciclo celular. Esta inconstância genética no interior das células provoca mutações, levando ao surgimento de neoplasias. (STOLER et al., 1999; SZOSTEK et al., 2006; CARMO; FIORINI, 2007).

As lesões denominadas pré-invasivas consistem em várias alterações que progridem até o carcinoma invasivo, o ponto inicial é a neoplasia intraepitelial

cervical (NIC 1), considerada uma displasia leve, sendo as células infectadas restrita a terça parte do epitélio; em sequência a NIC 2, que se trata de uma displasia moderada, observando-se o achatamento das células da parte superior do epitélio e ocupação por células infectadas, em cerca de dois terços da parte inferior do epitélio, sendo possível a observação de células intermediárias, com nucleação atípica e citoplasma incompleto, já na NIC 3 ocorre displasia acentuada e carcinoma *in situ*, tendo como base a porção acometida do epitélio cervical, sendo possível a verificação de mitoses e núcleos atípicos. (PEDROSA, 2003). Conforme Figura 4:

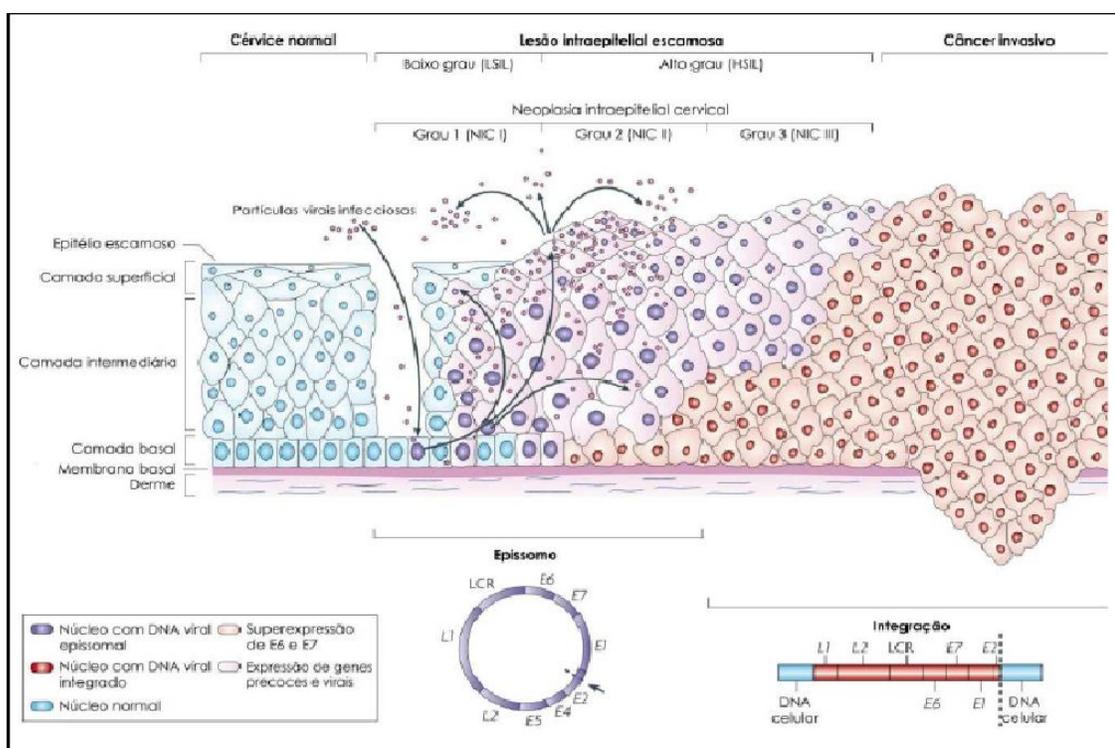


Figura 4 – Evolução das lesões de colo uterino

Fonte: Pedrosa (2003)

4.1.4 Epidemiologia e fatores de risco

A infecção pelo HPV varia muito, conforme a população estudada e sua localização geográfica, sendo o HPV 16 o que tem distribuição mais comum, exceto na África sub-Saariana, onde o tipo 35 é igualmente visto. (NG'ANDWE et al., 2007), seguido pelo HPV 18 que contribui com cerca de 10 a 20 % dos casos de câncer cervical, enquanto o HPV 16 encontra-se presente em 60 % dos carcinomas,

totalizando assim a prevalência destes dois genótipos em dois terços de todos os carcinomas cervicais no mundo. (BRASIL, 2013).

Os HPV 45, 31 e 33 são respectivamente os próximos de maior prevalência oncogênica, sendo esta ordem variável em cada região. (MEIJER; SNIJDERS; CASTLE, 2006). Nas Américas Central e do Sul, os HPV mais prevalentes são 16,18, 45, 31 e 33 (SILVA et al., 2006), diferentemente na Ásia, em que os tipos HPV 16, 18, 52 e 58 são os mais prevalentes. (CASTLE, 2006; CORRÊA, 2007).

A distribuição dos HPV pelo Brasil ocorre heterogeneamente, de forma que os tipos 16, 18, 35 e 58 são mais frequentemente encontrados nas mulheres do Rio de Janeiro, enquanto em Recife a prevalência é maior para os tipos 16, 31, 33, 58 e 18 respectivamente. Já em Belém, os tipos 16, 31, 33, 58 são detectados em mais de 20 % dos casos de NIC grau I, II e III. No Distrito Federal encontra-se frequentemente os tipos 16, 58, 31,18 e 33. (BRASIL, 2008).

Cerca de 20 a 30 % das mulheres do mundo estão infectadas pelo HPV (MENDEZ et al., 2005), com 35 % delas apresentando grau de anormalidades citológicas avançadas (MOLIJN et al., 2005), sendo evidenciado que a presença de mais de um genótipo está presente nos pacientes com carcinoma cervical (SASAGAWA et al., 2001; MOLIJN et al., 2005). Além disso, a imunidade do hospedeiro e a infecção estão ligadas, bem como outros fatores que contribuem para a infecção pelo HPV, elevando o risco de neoplasias. (PASSOS, 2008).

Segundo Munoz (2000), o início precoce das relações sexuais, número de parceiros, fatores hormonais, alta paridade, uso prolongado de contraceptivos orais, infecções por *Chlamydia trachomatis*, vírus Herpes Simples II, infecções por HIV, deficiência nutricional, tabagismo. fatores genéticos e até mesmo o baixo nível socioeconômico podem ser considerados cofatores na infecção do HPV.

4.1.5 Vacinas para HPV

O programa governamental de prevenção secundária do câncer de colo uterino no Brasil (exame de Papanicolau) apresenta baixa efetividade se comparado com os números que foram idealizados, assim, a prevenção primária se tornaria mais efetiva com a implementação da vacina no calendário do Sistema Único de Saúde (SUS). (ROSA, 2009; BRASIL, 2008).

O sequenciamento do genoma do HPV possibilitou o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra a infecção pelo HPV (NADAL, 2008), sendo altamente seguras e imunogênicas, compostas por partículas que não possuem o DNA viral. Deste modo, a vacina não altera a infecção existente, mas protege o indivíduo das cepas de HPV as quais foram expostos, através da produção de níveis muito elevados de anticorpos. São aplicadas três doses intramusculares com intervalos de dois e seis meses após a primeira aplicação, sendo recomendada para mulheres que ainda não iniciaram práticas sexuais, com idade mínima a partir dos nove anos. (NOVAES, 2008; NADAL, 2010).

No Brasil, duas vacinas estão atualmente disponíveis na rede particular de saúde, a Gardasil® (Merck & Co.), que é quadrivalente e cobre os sorotipos 16, 18, 6 e 11, com eficácia de quase 90 % contra infecções, e de 100 % nas alterações de cervix uterina; e a Cervirax® (Glaxosmithkline Biological) que atua contra os sorotipos 16 e 18, tendo 99,9 % de eficácia nas infecções persistentes e mais de 90 % nas lesões de colo do útero. (LINHARES, 2006)

A implantação destas vacinas no calendário do SUS está atualmente tramitando no Congresso Nacional. Essa medida pode resultar na diminuição acentuada de tumores malignos associados ao HPV, tornando-se importantes aliados na prevenção do câncer do colo do útero e na assistência a saúde da mulher. (BRASIL, 2013).

4.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV

O predomínio do DNA do HPV depende grandemente do método utilizado para diagnóstico das lesões específicas. (SOUZA, 2001). A utilização de metodologias adequadas é indispensável para a interpretação destas amostras. (GABRIEL, 2006).

No dia a dia clínico, são utilizados exames citológicos, colposcopia e biópsia, porém, com o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis em meados de 1980, foi possível identificar a presença do genoma viral nas células. (SILVA, 2006).

O teste de Papanicolaou, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), é muito eficaz no que se trata de diagnosticar precocemente lesões e prevenir o carcinoma invasivo, contudo, a incidência destas patologias, mantém-se elevada mundialmente, inclusive entre as mulheres brasileiras. (BEZERRA et al., 2005).

Assim, a introdução de critérios não clássicos associados aos testes moleculares passou a ser importante ferramenta para elucidação da infecção pelo HPV. (BRASIL, 2013).

4.2.1 Exame Papanicolau

A citologia é um método sugestivo, de triagem, realizado através da colpocitologia, sendo amplamente utilizado para evidenciar a presença de lesões no colo do útero que possam evoluir para neoplasias, é acessível, rápido, tem baixo custo e pode ser realizado por qualquer profissional da área da saúde que tenha prévio treinamento. (BEZERRA, 2005).

Foi desenvolvido em 1934 por George Papanicolau a partir da análise de esfregaços vaginais. Neste método, o material endocervical é coletado com auxílio de escova citológica e o material ectocervical com espátula de Ayres, e depois o material cervical é fixado em etanol 95 % ou fixador próprio para posterior interpretação das alterações morfológicas celulares. (MOTTA, 2001; CORDEIRO, 2005; TULIO, 2007; FARIA, 2008; LIMA, 2011).

A interpretação destes resultados se baseia no Sistema Bethesda para citodiagnóstico de 1991 e na classificação de Richart de 1967, onde foram introduzidos critérios clássicos e não-clássicos para a identificação do HPV. (NOBUYOSHI, 2005).

Os critérios citológicos considerados clássicos no diagnóstico de HPV são: coilocitose, na qual ocorre modificação nas células escamosas intermediárias, com aumento da área clara que envolve o núcleo, e bordas bem delimitadas; disceratose, que envolve presença de células espalhadas, em formato caudado e alongados, com alteração nuclear e aumento de tamanho. (NOBUYOSH, 2005).

Os critérios não-clássicos envolvem a presença de mais de um núcleo; cariorrexe, o qual é caracterizado pelo desaparecimento dos limites do núcleo e a cromatina fica condensada periféricamente formando grumos; células fantasmas, as quais possuem citoplasma mais claro, resultante da falta de compostos citoplasmáticos; células em fibra, nas quais o citoplasma adquire forma de uma fibra se tornando alongado; células gigantes, que podem apresentar presença de vários núcleos com tamanho aumentado, envolvidos por um halo bem nítido que separa os núcleos do citoplasma; células parabasais coilocitóticas. que possuem tamanho

reduzido, com núcleo aumentado e irregular, o citoplasma pode ser cianofílico ou anfofílico; condensação de filamentos, em que o citoplasma se apresenta fracamente corado e com fissuras; escamas anucleadas, que possuem ausência de núcleo e citoplasma queratinizado; grânulos ceratoialinos, onde aparecem células anucleadas e citoplasma condensado na forma de grânulos; halo perinuclear, no qual o núcleo se apresenta com uma área clara em torno de si que formando um halo; núcleo em borrões, em que a cromatina aparece como um borrão, o citoplasma adquire configurações orangeofílicas, com aumento do núcleo; núcleo em fibra, no qual a cromatina se mostra grumosa, com clareamento na parte inferior do núcleo, distorção do contorno nuclear e presença de tenofilamentos; núcleo hipercromático, que é caracterizado pela regularidade na cromatina e membrana nuclear com hipercromia. (NOBUYOSHI, 2005).

4.2.2 BIOLOGIA MOLECULAR

As técnicas de biologia molecular têm se mostrado importantes na busca e reconhecimento de genoma viral do HPV nas células, estas metodologias estão sendo incorporadas gradativamente. (RIVOIRE, 2006).

O diagnóstico da infecção pelo HPV com base nos testes moleculares teve início no ano de 1980, utilizando sondas de ácidos nucleicos que haviam sido liberadas para comercialização recentemente. (HUBBARD, 2003)

Os testes de biologia molecular podem ser classificados e divididos em três grupos:

- 1) Hibridação molecular com sondas de ácidos nucleicos: foram as primeiras técnicas utilizadas, apresentam sensibilidade variada e o tempo para execução do trabalho é moderado. Os principais exemplos desta técnica são: *Southern blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* ou com fluorescência.
- 2) Amplificação de sinal: é uma metodologia ótima para triagem de pacientes com alterações citológicas (exemplo: teste de captura híbrida - HCII).
- 3) Reação de amplificação: é a metodologia mais abrangente, possibilita a identificação do HPV e sua genotipagem, o grau da infecção, além de permitir a reprodução *in vitro* da parte específica do DNA do vírus (exemplo: Reação em Cadeia da Polimerase - PCR). (HUBBARD, 2003; MOLIJN et al., 2005).

A confirmação da infecção por HPV através da biologia molecular tem se mostrado muito importante (JOHNSON et al., 2003), principalmente quando associada ao exame Papanicolau e a colposcopia.(SILVA et al. , 2006). Assim, as técnicas empregadas do decorrer das décadas possuem vantagens e desvantagens, cada qual com suas limitações, porém de extrema importância para o diagnóstico do HPV. (VILLIERS, 1997).

4.2.3 Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* (HIS) passou a estimular o interesse de pesquisadores somente a partir da década de 1980. Tal técnica se baseia na detecção de um gene específico ou seus transcritos. Utilizando-se sondas que se complementam (sequências de nucleotídeos), desenvolvidas a partir de fragmentos conhecidos do DNA ou RNA viral que se deseja identificar. Esse emparelhamento ocorre de forma espontânea, de modo que cada sequência de nucleotídeos complementar (sonda) é capaz de hibridizar 7,9 Kb de pares de bases de DNA. (NORONHA, 1999).

Para evidenciação da reação é necessário marcar as sondas com moléculas sinalizadoras (biotina), desta forma, o núcleo de cada célula poderá ser visualizado, este tipo de reação imunohistoquímica só é possível porque as se utilizaram do substrato, tornando a coloração nuclear marrom quando visualizada em microscópio. A HIS torna possível correlacionar os resultados com aspectos histopatológicos, de modo que as marcações dos padrões físicos se apresentaram difuso (epissomal) quando o núcleo fica inteiramente corado (ou seja o DNA não esta integrado a célula do hospedeiro), ou com a presença de pontos, onde pontos (núcleo hibridizado) coloridos podem ser visualizados, evidenciando a interação do DNA do HPV com o genoma do hospedeiro, ou podendo ainda ser misto, apresentando-se na forma epissomal e em pontos simultaneamente. O resultado positivo é determinado quando cerca de 25 % das células se apresentam coradas. (BAGARELLI, 2004).

A HIS é um método de boa especificidade, porém tem menor sensibilidade em relação a outros métodos, conforme a técnica de amplificação de sinais utilizada é possível detectar de uma a 10.000 cópias viras por célula, aumentando assim sua sensibilidade analítica. (RIVERO, 2006).

A grande vantagem da reação HIS é a possibilidade de localizar, nos tecidos, genes específicos, podendo estes tecidos estar parafinados ou congelados, além de identificar os genótipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45 e 56, permitindo a associação do DNA do microrganismo com a morfologia dos mesmos e a patologia desenvolvida. (BAGARELLI, 2004)

4.2.4 Captura híbrida II

A captura híbrida II (CHII) é o método mais utilizado na detecção do HPV. (RODRIGUES, 2009). É uma técnica quantitativa e qualitativa, capaz de reconhecer o DNA viral e qual seu tipo, sendo o único reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). É capaz de pesquisar os tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. (TULIO, 2007).

Além disso, é considerada muito específica e tem reprodutibilidade de 98 %. É realizada em microplacas, utiliza sondas hibridadoras (anticorpos), que se complementam ao genoma viral pesquisado, deste modo às interações (hibridação) acontecem, dando origem a sondas específicas com o DNA do vírus, posteriormente é capturado nas bordas da microplaca, nesta fase o sinal já foi amplificado. Em seguida, recebe marcação com fosfatase alcalina, permitindo a leitura do material por quimiluminescência, deste modo se permite contar até 0,1 cópias de DNA viral por célula, evidenciando sua sensibilidade. (CARVALHO; OYAKAWA, 2000; SANKARANARAYANAN et al., 2009; GIRIANELLI, 2010).

Assim, os resultados são expressos em relação a RLU (unidade relativa de luz), sendo considerados positivos (presença de carga viral) quando o valor é maior ou igual a 1 pg/mL. Quando carga viral for superior a 100 pg/mL, o risco para NIC II e III aumenta proporcionalmente. A desvantagem do método é que ele não detecta todos os tipos virais e não é muito eficiente quando a infecção viral está no começo. (TULIO, 2007).

4.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR convencional foi desenvolvida no fim da década de 1980, por Kary Mullis. (SAIKI, 1988). Essa metodologia detecta níveis extremamente baixos de carga viral, possuindo assim elevada sensibilidade, especificidade e eficiência. Além

disso, é considerada superior as outras uma vez que a detecção do vírus pode ser feita enquanto ainda é considerada não-produtiva. (RODRIGUES, 2009).

Atualmente, uma variação mais atualizada da PCR está disponível no mercado, a PCR-TR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real), tornando possível diferenciar sequências de pares de bases já amplificadas através da análise da temperatura em que as fitas se separaram, permitindo maior detecção de tipos virais e menor contaminação da amostra. (LIMA, 2011).

Para a identificação e detecção do HPV pela PCR-TR têm sido utilizadas combinações entre *primers* (Iniciadores necessários para o início da replicação) complementares à região mais conservada do gene, possibilitando a distinção do tipo de HPV, os iniciadores mais empregados são: GP05/06, e a versão mais longa GP05+/06+ e, o considerado universal, MY09/11. (PITTA, 2010).

As reações ocorrem em capilares fechados que facilitam a transferência de calor, após a realização de 45 ciclos, onde ocorre a desnaturação, anelamento e extensão das cadeias, em temperaturas respectivas de 90 e 65 °C, gerando a amplificação do DNA-alvo. A visualização desta amplificação ocorre por meio de eletroforese em gel de agarose. (CHAN et al., 2006; RODRIGUES, 2009; LIMA, 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) se constitui em um grave problema de saúde pública, afetando milhões de mulheres no mundo em idade sexualmente ativa. Esta infecção, principalmente com tipos de alto risco oncogênico, está associada ao desenvolvimento de câncer do colo de útero. Em vista disso, vários métodos têm sido utilizados para o seu rastreamento, como o exame de Papanicolaou e, mais recentemente, os métodos de biologia molecular. Além disso, métodos profiláticos, por meio de vacinas, também foram desenvolvidos como meio de prevenir esta infecção.

REFERÊNCIAS

BAGARELLI, Lúcia Buchalla; OLIANI, Antonio Hélio. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, Fev. 2004

BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, 32S: S1-S6, 2005.

BEZERRA, S. J. S. et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 244-265, 2002.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. 2013. Disponível em: <[HTTP://WWW.CNPT.EMBRAPA.BR/BIBLIO/CO/P_CO270_F1.HTM](http://WWW.CNPT.EMBRAPA.BR/BIBLIO/CO/P_CO270_F1.HTM)>. Acesso em 3 maio 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarBusc>>. Acesso em: 16/04/2013

BRASIL. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 12 março 2013.

CAMPOS, M.S. Animal modes of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research*, 89: 249-261, 2002.

CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. **Sabios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.

CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. **I Consenso brasileiro de HPV**. BG Cultural, 2000.142p.

CARVALHO, M. *et al.* **Braz J Infect Dis**, v. 7, p. 1-8, 2003.

CASTLE, P.E. *et al.* Absolute risk of a subsequent abnormal papamong oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. **Cancer**, v. 95, n 10, p. 2145-51, 2002.

CASTLE, P.E. *et al.* Results of human papillomavirus DNA testing with the hybrid capture 2 assay are reproducible. **J Clin. Microbiol**, v. 40, p. 1088-90, 2006.

CHAN, P. K. S. *et al.* Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. **International Journal of cancer**, v.118, p. 243-245, 2006.

CLIFFORD, G. *et al.* Human papillomavirus types among infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p. 2337-2344, 2006.

CORDEIRO, Maria Rachel Aguiar *et al.* . Inspeção visual do colo uterino após aplicação de ácido acético no rastreamento das neoplasias intra-epiteliais e lesões induzidas por HPV. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, Fev. 2005.

CORRÊA, C. M. Prevalência e multiplicidade do papilomavirus humano (HPV) na cérvix uterina de mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em estudo multicêntrico. 2007.148f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

FAIT, G. *et al.* Contribution of human papillomavirus testing by hybrid capture in the triage of women with repeated abnormal Pap smears before colposcopy referral. **Gynecology Oncol**, v. 79, p. 177-80, 2000.

FARIA, Iwens Moreira de *et al.* . Acuidade da citologia oncológica para o diagnóstico da infecção pelo HPV no colo uterino de mulheres portadoras do HIV. **Revista Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 9, Set. 2008.

GABRIEL, M.; Tormena, E.; Souza, R.. Comparação entre teste de detecção de DNA do papilomavirus humano pelo sistema de captura híbrida com citologia em esfregaços cervicais. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, América do Norte, 2006

GIRIANELLI, Vania Reis; THULER, Luiz Claudio Santos; SILVA, Gulnar Azevedo e. Prevalência de HPV em mulheres assistidas pela estratégia saúde da família na Baixada Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, Jan. 2010

GOLDBAUM, M. Epidemiologia, história natural e prevenção de doenças. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & saúde**. 6.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 17-35.

HILLEMANN, P. et al. Estimation of the incidence of genital warts and the cost of illness in Germany: A cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v 8, n 76, p110, 2008. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/8/76/prepub> acesso em: 31-10-2012.

HILLMAN RJ, RYAN BK, Botcherby M, Taylor-Robinson D. Changes in HPV infection in patients with anogenital warts and their partners. **Genitourin Med**. 1993;69(6):450-6.

HO, Werther Brunow de et al. Inhaled nitric oxide and high concentrations of oxygen in pediatric patients with congenital cardiopathy and pulmonary hypertension: report of five cases. **Sao Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 116, n. 1, Fev. 1998.

HOQUE M. & KADER SB. Evaluation of cervical cancer screening program at a rural community of South Africa. **East Afr J Public Health**. 2008;5(2):111-6.

HOWLEY, P.M. Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, 117: 113-126, 2006.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2006. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 03/05/2013.

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

JOHNSON, T. et al. Routine genotyping of human papillomavirus samples in Denmark. **Acta Pathologica, Microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 398-404, 2003.

KANODIA, S. et al. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

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.

LIMA JUNIOR, Sérgio Ferreira de et al . Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 10, Oct. 2011

LINHARES, Alexandre C.; VILLA, Luisa Lina. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). **J. Pediatr.** (Rio J.), Porto Alegre, v. 82, n. 3, July 2006 .

LETO, M.G.P. et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, Apr. 2011.

LORINCZ AT. Human papillomavirus detection tests. In: Holmes KK, 12. **Mardh PA, Sparlig PF, Wiemer PJ, editors. Sexually transmitted diseases**. New York: McGraw-Hill; 1990. p. 953-9.

MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; CASTLE, P. E. Clinical utility of HPV genotyping.**Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12-17, 2006.

MOLIJN A, KLETER B, Quint W, Van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections.**J Clin Virol**.2005;32S:S43-51.

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.

MOTTA, E.V. DA et al . Colpocitologia em ambulatório de ginecologia preventiva. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 47, n. 4, Dez. 2001.

MUNOZ, N. et al. **Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 3-10, 2000.

NADAL, Luis Roberto Manzione; NADAL, Sidney Roberto. Indicações da vacina contra o papilomavirus humano. **Rev bras. colo-proctol.** Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, 2008.

NADAL LRM, Nadal SR. Indicações da vacina contra o Papilomavírus Humano. **Rev Bras Coloproctol.** 2010 Jan-Mar; v.48 n 3:124-6.

NG'ANDWE, C., LOWE, J.J., RICHARDS, P.J., HAUSE, L., WOOD, C., ANGELETTI, P.C. The distribution of sexually transmitted human papillomaviruses, 2007

NOBUYOSHI KANESHIMA, Edilson et al . Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papillomavirus humano (HPV) previamente detectado por PCR. **Acta bioquím. clín. latinoam. La Plata**, v. 39, n. 1, mar 2005

NORONHA, Vânia et al . Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 32, n. 3, Jun 1999.

NOVAES, Hillegonda Maria Dutilh. A vacina contra HPV e o câncer de colo de útero: desafios para a sua incorporação em sistemas de saúde. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 11, n. 3, Sept. 2008 .

PASSOS, M, R, L. **Médico esclarece questões sobre HPV e vacinação: 2º Congresso da Comunidade de Países de Língua Portuguesa sobre DST/AIDS.** Rio de Janeiro. Livro de Resumos, 2008.

PEDROSA, M. L. Perfil Epidemiológico de Mulheres Portadoras de Atipias Escamosas de Significado Indeterminado Atendidas pelo Programa de Controle do Câncer de Colo Uterino no Município do Rio de Janeiro. 2003. 109f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

PITTA, Denise Rocha et al . Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, Jul 2010 .

RAMOZ, N., RUEDA, L.A., BOUADJAR, B., MONTOYA, L.S., ORTH G., FAVRE, M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasiaverruciform. **Nature Genetics**, 32: 579-581, 2002.

RIVERO, Elena Riet Correa; NUNES, Fabio Daumas. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Braz. oral res.**, São Paulo, v. 20, n. 1, Mar. 2006

RIVOIRE, Waldemar Augusto et al . Biologia molecular do câncer cervical. Rev. Bras. **Saude Mater. Infant.**, Recife, v. 6, n. 4, 2006

RODRIGUES, Adriana Dalpicolli et al . Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, Dec. 2009 .

ROSA, Maria Inês da et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 5, Maio 2009 .

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 453-459, 2007.

SANKARANARAYANAN R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh 2009

SASAGAWA, T. et al. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in japanese women. **Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention**, v. 10, p. 45-52, 2001.

SCHILLER, JT, Frazer IH & Lowy DR. Human Papillomavirus vaccines. 5th ed., 2008.

SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

SILVA, T. T. et al. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 285-291, 2006.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p.45-59, 2001.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. *Archives of*. 1999.

SYRJANEN S.M., Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomaviruses in cell cycle regulation. **Ann Med**. 1999;31:175-87.

SZOSTEK, S. et al. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 603-607, 2006.

TULIO, Siunara et al . Relação entre a carga viral de HPV oncogênico determinada pelo método de captura híbrida e o diagnóstico citológico de lesões de alto grau. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, Feb. 2007 .

TYRING SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J Am Acad Dermatol** 2000; 43; 518-526.

VILLIERS, E-M. et al. Papillomavirus and typing. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 199-206, 1997.

VINCE, A. et al. Clinical utility of molecular detection of human papillomavirus in cervical samples by hybrid capture technology. *J Clin Virol*, v. 25, p. S109-12, 2002. Woodman CB, Collins SI, Young LS (2007). The natural history of cervical PV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, 7, 11-22.