

ARTIGO ORIGINAL

Diagnóstico molecular de HPV em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam o papanicolaou

Molecular diagnosis of HPV in cervicovaginal samples from women undergoing pap smears

Edilaine Leimann Kenne¹, Marina Gassen¹, Clairton Edinei dos Santos¹, Luiza Naujorks Reis¹, Danielly Joani Bullé¹, Jane Dagmar Pollo Renner¹

¹Universidade de Santa Cruz do Sul (Unisc), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

Recebido em: dezembro 2014 / Aceito em: dezembro 2014
janerenner@unisc.br

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) representa um importante problema de saúde pública por sua alta transmissibilidade e atuar no desenvolvimento de lesões cérvico-vaginais e câncer do colo de útero. **Objetivo:** realizar a pesquisa molecular do vírus HPV em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam a coleta de papanicolaou ou pelo Serviço Integrado de Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul e pelo Centro Materno Infantil no município de Santa Cruz do Sul-RS. **Método:** foi realizado um estudo transversal no período entre março a junho de 2014. O estudo baseou-se na coleta de dados clínicos epidemiológicos e na análise de amostras cérvico-vaginais de 62 mulheres, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para presença do HPV, utilizando os *primers* consenso MY09/MY11; para a detecção dos genótipos 16 e 18, foram utilizados *primers* específicos. **Resultados:** o DNA-HPV foi encontrado em 2 mulheres participantes do estudo (3,2%). Destes casos positivos para HPV, uma participante apresentou HPV 16 de alto risco oncogênico, com alteração intra-epitelial de alto grau no exame citológico. **Considerações finais:** com o método molecular foi possível identificar o vírus HPV e o subtipo 16. Os métodos moleculares servem para auxiliar o método tradicional do papanicolaou, identificar lesões pré-neoplásicas, infecções latentes ou subclínicas e relacionar o tipo viral envolvido na infecção.

Palavras-chave: HPV; Câncer cervical; PCR.

ABSTRACT

Infection with human papillomavirus (HPV) is a

*major public health problem due to its high transmissibility and role in development of cervicovaginal lesions and cervical cancer. **Objective:** performing molecular analysis of HPV virus in cervical smears of women who underwent the pap smears collect at Integrated Health Service from the University of Santa Cruz do Sul and at the Maternal and Child Health Center in Santa Cruz do Sul. **Method:** a cross-sectional study was conducted from March to June 2014. The study was based on epidemiological data collection and clinical analysis of cervical smears of 62 women by PCR for the presence of HPV DNA fragments using consensus primers MY09 / MY11; genotypes 16 and 18 were searched with specific primers. **Results:** HPV DNA was found in 2 women (3.2%). One of these 2 positive HPV cases was HPV 16 with high oncogenic risk and presented intraepithelial high-grade change in cytological examination. **Final considerations:** through the molecular method was possible to identify the HPV DNA virus and HPV subtype 16. Molecular methods can assist the traditional method of pap smears, helping to identify precancerous lesions, latent or subclinical infections and appoint the viral type involved in the infection.*

Keywords: HPV; Cervical cancer; PCR.

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus do grupo papovavírus, com mais de 100 tipos reconhecidos atualmente, 45 dos quais podem infectar o trato genital. Eles estão divididos em dois grupos, de acordo com seu potencial de oncogenicidade. Os tipos de alto risco oncogênico, quando associados a outros co-fatores, têm relação com o desenvolvimento das neoplasias

intra-epiteliais e do câncer do colo do útero, da vulva, da vagina e da região anal^{1,2}.

O HPV é o agente causal de muitas doenças epiteliais e de mucosas, entre elas estão as verrugas genitais, as quais são consideradas a doença mais comum ocorrente entre a população sexualmente ativa, e também o tipo mais comum de câncer em mulheres, o cervical, causado por infecções persistentes por genótipos de HPV de alto risco oncogênico. O câncer cervical é o mais comum nos países em desenvolvimento e umas das principais causas de morte por câncer entre as mulheres³.

O câncer cervical é o terceiro tipo mais comum de câncer entre as mulheres no Brasil. Em 2014. Estima-se que 15.590 novos casos de câncer do colo do útero irão ocorrer no Brasil⁴. A incidência de câncer do colo do útero evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Por outro lado, com exceção do câncer de pele, é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente. É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esse câncer, pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres, na faixa etária de 25 a 65 anos, com o teste de Papanicolaou e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou *carcinoma in situ*. Para tanto, é necessário garantir a organização, a integralidade e a qualidade do programa de rastreamento, bem como o seguimento das pacientes¹.

Na maioria dos casos, o tumor cervical tem evolução lenta e sua prevenção consiste em identificar o mais precocemente possível às lesões precursoras no epitélio cervical, permitindo o tratamento eficaz, antes do aparecimento de invasão local e disseminação da doença⁵.

Aproximadamente, todos os casos de câncer do colo do útero são causados por um dos 15 tipos do HPV, conhecidos como oncogênicos, sendo os tipos mais comuns o HPV16 e o HPV18. Outros fatores que contribuem para a etiologia desse tumor são o tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, uso de contraceptivos orais, multiparidade, baixa ingestão de vitaminas, iniciação sexual precoce e coinfeção por agentes infecciosos como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e *Chlamydia trachomatis*^{1,6}.

Na última década, vários estudos têm apontado o aumento significativo da incidência de infecções por HPV genital e, atualmente, estima-se que cerca de 75% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas em qualquer momento em sua vida^{4,7}.

A utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), no diagnóstico molecular de HPV tem se mostrado altamente sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos, bem como na resolução de dúvidas originadas, durante o diagnóstico citohistopatológico e o exame colposcópico, não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas também nas infecções latentes ou subclínicas associadas a esse agente viral⁸.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é pesquisar o vírus HPV, por PCR em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam a coleta de Papanicolaou, pelo Serviço Integrado de Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC e pelo Centro Materno Infantil no município de Santa Cruz do Sul-RS.

MÉTODO

Trata-se de um estudo descritivo-analítico transversal e observacional, aprovado pelo Comitê de Ética da UNISC, protocolo 544.234, que foi realizado no mês de fevereiro de 2014, incluindo 62 amostras cérvico-vaginais de mulheres, que realizam o exame de papanicolaou no Sistema Integrado de Saúde da UNISC (SIS) e no Centro Materno Infantil (CEMAI) no município de Santa Cruz do Sul-RS. O SIS tem como principal função exercer atividades pertinentes aos cursos de psicologia, enfermagem e nutrição, centralizando atividades teórico-práticas destes cursos, atendendo à comunidade acadêmica e regional, a partir da realização de projetos que visem a promoção da saúde, em parceria com outras áreas do conhecimento acadêmicas e ou comunitárias, desenvolvendo atividades de ensino, pesquisa e extensão. O CEMAI é uma Unidade Básica de atendimento da Secretaria Municipal de Santa Cruz, com atendimento pediátrico, ginecológico e obstétrico que é realizado através de agendamento, de segunda à sexta-feira.

As coletas ocorreram entre os meses de março e abril, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido por parte das pacientes, o qual foi o critério de inclusão. As amostras cérvico-vaginais para o exame molecular foram coletadas com auxílio de escovas endocervicais do tipo *cytobrush*. O material clínico coletado foi acondicionado em frascos, contendo 1,5 mL de solução tampão T.E. (Tris-HCl10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e estocado a -20°C até o momento da extração do DNA, objetivando diagnóstico pela técnica de PCR. Para a extração de DNA foi utilizado o método de digestão enzimática com proteinase K, conforme o descrito por Mahony *et al*⁹.

Tabela 1 - Sequências dos primers, seus pares de base e temperatura de anelamento da Beta- globina, do HPV, do HPV16 e do HPV18 utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Região de amplificação	Temperatura de anelamento	Primers	Pares de bases (pb)
Beta-Globina	55°C	GH 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' PC04 5' CCA CTT CAT CCA AGT TCA CC 3'	268 pb
HPV	50°C	MY09: 5' CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAAATGG 3'	450 pb
HPV 16	50°C	16D 5' TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA 3' 16R 5' ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC 3'	152 pb
HPV 18	50°C	18D 5' AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA 3' 18R 5' CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT 3'	216 pb

Para verificar a amplificação do gene controle do DNA, foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da beta-globina humana ($\beta 2$) com os *primers* descritos na Tabela 1. Para determinar a presença do HPV das amostras cervico-vaginais foram utilizados os *primers* descritos por Manos *et al*¹⁰. Para a tipagem molecular dos genótipos 16 e 18 nas amostras positivas, para os *primers* de consenso MY09/11, utilizou-se os *primers* conforme descrito por Grce *et al*¹¹.

As reações da beta-globina humana, HPV, HPV 16 e 18 continham 50 μ l de mistura com os seguintes componentes: 2,5 μ l de tampão de PCR 10X (10 mM de Tris-HClpH8 e 50 mM de KCl) (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA); 4 mM de MgCl₂; 10 mM de dNTPs (desoxirribonucleosida 5'-triofosfatos – dATP, dCTP, dGTP e dTTP – Fermentas®); 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil) e 100 ng do DNA. A seguir, no termociclador (Geneamp system 9700 da AppliedBiosystems®), essas reações consistiram em um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento conforme a Tabela 1, e extensão

a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos¹². Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio 1 μ g/mL para análise.

Os dados foram analisados pela estatística descritiva. Foi calculada a frequência do HPV e dos subtipos na amostra analisada. Foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0 para análise dos resultados.

RESULTADOS

Foi realizada a coleta de 33 amostras de participantes atendidas no SIS e 29 amostras de participantes atendidas no CEMAI, com média de idade de 42,67 anos, no período de março à abril de 2014. Os dados do diagnóstico molecular, através da técnica de PCR destas amostras, bem como sociodemográficos, comportamentais e reprodutivos destas pacientes, estão descritas na Tabela 2.

Observa-se que das 62 pacientes analisadas, todas amplificaram o gene controle da β -globina humana.

Tabela 2 - Aspectos sociodemográficos, comportamentais e reprodutivos das 31 mulheres participantes do estudo no Sistema Integrado em Saúde (SIS) e no Centro Materno Infantil no mês de março e abril de 2014.

Variáveis	PCR – HPV N:62		p
	SIM	NÃO	
Idade	18 a 25 anos	0	0,250
	26 a 30	1	
	31 a 35	0	
	36 a 40	1	
	41 a 45	0	
	Mais de 45 anos	0	
Civil	Solteira	2	0,139
	Casada	0	
	Separada	0	
	Viúva	0	
Ferida	Sim	1	0,329
	Não	1	
HPV	Sim	1	0,190
	Não	1	
Parceiros	1 a 2	0	0,119
	3 a 4	1	
	Mais de 5	1	
Anticoncepcional	Sim	1	0,436
	Não	1	
Fumante	Sim	1	0,190
	Não	1	
Preservativo	Sim	1	0,924
	Não	0	
	De vez em quando	1	
Filhos	Não tem	1	0,690
	1	0	
	2	1	
	mais de 3	0	
Escolaridade	F. incomp	0	0,381
	F. comp	0	
	M. incomp	0	
	M. comp	1	
	S. incomp	1	
	S. comp	0	
Total	2	60	

F: fundamental; M: médio; S: superior; incomp: incompleto; comp: completo.

Sendo assim, a análise da presença do DNA do HPV foi efetuada em 62 amostras. O DNA-HPV foi encontrado em 2 mulheres participantes do estudo (3,2%) e, destes casos positivos para HPV, uma participante apresentou HPV 16 de alto risco oncogênico. A participante que apresentou o HPV 16, na técnica de PCR confirmou o resultado obtido no exame de Papanicolaou, apresentando uma alteração intra-epitelial de alto grau.

A idade das mulheres variou de 19 a 66 anos. A faixa etária mais prevalente da coleta do Papanicolaou foi das mulheres acima dos 45 anos (51,6%). As mulheres com idade entre 26 e 40 anos correspondeu a faixa etária em que se observou a maior prevalência da infecção pelo HPV (3,2%).

Em relação ao estado civil, as duas participantes diagnosticadas com DNA-HPV são solteiras, tendo uma prevalência no estudo de 38,7%, não sendo significativo. Na avaliação de histórias de feridas no colo do útero, 33,8% já tiveram ferida, sendo que as duas mulheres que tiveram o vírus, uma delas teve ferida no colo do útero. Já, em histórico de HPV, no presente estudo, 14,51% das participantes tiveram o vírus. O comportamento sexual foi avaliado através do número de parceiros e, apesar de não ter significância estatística, observou-se uma maior prevalência de DNA-HPV entre as mulheres que tiveram entre três ou mais parceiros.

A frequência do uso de anticoncepcionais orais (ACO) foi de 27,41%. Não houve diferença estatística quanto à prevalência do HPV entre as usuárias e não usuárias de ACO. Em relação à história de tabagismo, 14,51% das mulheres eram tabagistas. Em relação ao HPV, uma das mulheres infectadas pelo HPV era tabagista.

Quanto ao uso de preservativos, 41,9% das mulheres participantes do estudo não usam e 40,3% usam de vez em quando. Em relação ao HPV, às mulheres que apresentaram o vírus ficaram nestes dois grupos acima. A relação entre o grau de escolaridade e a presença do HPV não mostrou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, houve uma prevalência maior nas pacientes com ensino médio completo.

DISCUSSÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é geralmente reconhecido como a causa direta do câncer cervical¹³. Diversos fatores parecem estar associados à presença de infecção genital pelo HPV, especialmente os referentes ao comportamento sexual (idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais ao longo da vida e estado marital) e aqueles relacionados à situação socioeconômica (escolaridade)¹⁴. Fatores sociodemográficos e ginecológicos também apresentam associação com a infecção viral¹⁵.

As taxas de detecção de HPV dependem da população estudada, o método de detecção, o tipo de amostra e como ela é obtida. No presente estudo, a maior taxa de detecção do HPV foi observada em mulheres com idade inferior a 40 anos. A idade é um dos fatores determinantes para infecção pelo HPV, apresentando um pico em mulheres mais jovens, havendo declínio posterior com a idade.

Em todas as regiões do mundo, a prevalência do HPV foi maior em mulheres com menos de 35 anos de

idade, diminuindo em mulheres de idade mais avançada. No presente estudo, foi encontrada uma maior prevalência entre 26-40 anos de idade. Na África, nas Américas e Europa, um segundo pico de prevalência clara de HPV foi observado em mulheres com 45 anos ou mais. Com base nestas estimativas, cerca de 291 milhões de mulheres no mundo são portadoras de DNA do HPV, dos quais 32% estão infectadas com HPV16 ou HPV18, ou ambos¹⁶.

Em um estudo feito por Fedrizzi¹⁷, em Santa Catarina, Brasil, o DNA-HPV foi encontrado em 21 mulheres das 100 participantes do estudo, sendo que a faixa etária mais prevalente destas mulheres foi acima de 45 anos de idade. Em um estudo feito por Oliveira¹⁸, na cidade de Rio Grande, RS, Brasil, os fatores de risco para infecção foram: pacientes com idades ≤ 20 anos, início precoce das relações sexuais, ausência do exame citopatológico e diagnóstico de citopatológico alterado. No entanto, a multiparidade constitui-se como fator de proteção para a infecção. Um estudo realizado por Nonnenmacher *et al*¹⁹, em Porto Alegre, RS, Brasil, que estudaram 975 mulheres, observaram uma frequência aumentada de positividade para o HPV em mulheres mais jovens, com maior escolaridade, casadas ou divorciadas, nulíparas, com um maior número de parceiros sexuais ao longo da vida, com idade precoce de início das relações sexuais e com citologia cervical, mostrando lesão cervical de baixo e alto grau.

A frequência reduzida de HPV no grupo de mulheres estudadas pode ser atribuída ao fato de a maioria delas não usar o tabaco, possuir 40 anos ou mais e ser casada, parceria sexual fixa, com mais de dois filhos e ter iniciado a vida sexual entre 19 e 21 anos, que são fatores que não se encaixam no grupo de fatores de risco para o HPV. Mas, nas mulheres que apresentavam o HPV-DNA, a multiparidade não se relacionou com os casos de HPV. Quanto ao número de parceiros sexuais, observou-se uma maior prevalência de DNA-HPV positivo entre as mulheres que tinham mais de três parceiros e na avaliação de citopatológico alterado, uma das pacientes (50%) que tiveram HPV-DNA teve ferida no colo do útero.

Um achado que contradiz nosso estudo é referente ao nível de escolaridade, pelo qual se observou que as mulheres com mais anos de escolaridade estão positivamente associadas à infecção quando comparadas às de menor tempo de escolaridade. A explicação para esse fato poderia ser de que mulheres com maior escolaridade teriam mais acesso à informação e poderiam utilizar métodos adequados para a prevenção dessa infecção ou poderia também ser resultado de um efeito amostral em que se observa uma menor frequência de HPV genital, nas mulheres com menor escolaridade¹⁹.

A grande importância do conhecimento desta doença nos jovens é um dos principais fatores associados às infecções por HPV, pois se dá pelo aumento da precocidade nas relações sexuais, o aumento no número de parceiros e a falta do uso constante do preservativo. As taxas de prevalência cumulativa são da ordem de 82% entre adolescentes, sendo que quase todas são sexualmente ativas e possuem alto risco de adquirir HPV^{14,15}. No presente estudo, as mulheres que apresentavam a infecção pelo HPV não usavam preservativos ou usavam de vez em quando.

Grande parte das infecções é assintomática e eficientemente debelada pelo sistema imunológico. Do mesmo modo, tanto as lesões de baixo quanto as de alto grau causadas por HPV podem regredir nas adolescentes, nas gestantes adolescentes e adultas jovens, devendo estas receber educação apropriada sobre o HPV e os riscos associados à infecção, sendo encorajadas a obter acompanhamento ginecológico apropriado após o início da atividade sexual².

Os HPV-16 e HPV-18 representam cerca de 70% destes cânceres do colo do útero, vagina e ânus e por cerca de 30-40% dos cânceres da vulva, pênis e orofaringe. Embora o HPV seja uma causa necessária de câncer do colo do útero, não é uma causa suficiente. Assim, outros cofatores são necessários para a progressão de infecção, pelo HPV cervical ao câncer²⁰.

De acordo com outros estudos, o HPV-16 é o tipo mais prevalente em todas as regiões brasileiras, mas há uma variação em relação aos tipos e regiões. O HPV 18 é o segundo mais prevalente no Norte, Sudeste e Sul do Brasil e os 31 e 33 são os próximos mais prevalentes no Nordeste e Centro do Brasil, respectivamente²¹. No presente estudo, de 62 mulheres foi encontrado 3,2% da infecção pelo HPV e destas 1,6% do HPV-16. Em um recente trabalho realizado em 18 países, detectou-se em 46,5% dos casos de lesões intraepiteliais de alto grau, o HPV 16 e, em 8,9%, o HPV-18. Nos casos de câncer cervical invasivo foram detectados 53,2% de HPV-16 e 13,2% de HPV-18²².

Em um estudo feito por Freitas *et al*²³, os quais investigaram a frequência da infecção por HPV e os tipos 16 e 18 em amostras cervicais de pacientes atendidas em dois serviços públicos de saúde, da cidade de Belo Horizonte, MG, Brasil, dentre as 174 amostras analisadas, 20,7% apresentaram lesões escamosas intra-epiteliais e/ou invasoras detectadas na análise citopatológica, das quais 94,4% estavam infectados pelo HPV. HPV 16 foi encontrado em 20% dos casos de lesões intra-epiteliais de baixo grau e em 40% e 50% das escamosas de alto grau, lesão intra-epitelial e carcinoma escamoso invasor, respectivamente. O HPV-18 foi detectado em 6,7% da lesão de baixo grau. Em 50% dos casos de lesão de alto grau, o tipo de HPV não foi determinado. O HPV 16 foi o tipo de vírus mais frequentemente detectado. Entretanto, mais do que 50% das amostras positivas, no exame citopatológico, foram negativos para o HPV 16 e 18, o que indica que, possivelmente, outros tipos de vírus estão presentes em relativa alta frequência na população estudada. No presente estudo, houve relação de uma paciente com o genótipo HPV-16 e o exame citopatológico que apresentou a lesão intra-epitelial de alto grau, da mesma forma, no outro caso do diagnóstico de HPV-DNA, não foi possível correlacionar o tipo viral e a lesão cérvico-vaginal.

Em um estudo feito por Ayres²⁴, as técnicas de citologia disponíveis resultam em diversas classificações e estimativas de prevalência do HPV. No entanto, considerando, separadamente, os estudos, segundo a técnica utilizada, observa-se que a prevalência do HPV tem aumentado. O HPV16 foi o tipo mais frequente entre as mulheres, independentemente do resultado de citologia. No presente estudo, o HPV 16 foi encontrado em uma participante apresentando alterações citológi-

cas causadas pelo HPV.

Em um estudo feito por Fernandes²⁵, a prevalência dos genótipos de alto risco oncogênico foi mais elevada entre os resultados citopatológicos que não mostravam alterações intra-epiteliais de alto ou baixo grau. Isso poderia ocorrer devido as limitações importantes nas avaliações citológicas, como resultados falso-negativos advindos de erros na coleta, na preparação e na leitura das amostras citológicas, ou visto que a infecção pelo HPV é um fenômeno progressivo e, dependendo do tempo de infecção, sua presença ainda não foi capaz de causar alterações celulares detectáveis pelos métodos citopatológicos e anatomopatológicos convencionais. Com o exame citopatológico associado à detecção do DNA do HPV por técnicas de biologia molecular é a alternativa para identificar precocemente pacientes com elevado risco de desenvolver câncer cervical²⁶.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico molecular de HPV foi possível identificar o vírus HPV e o subtipo 16. Os métodos moleculares servem para auxiliar o método tradicional das lesões cérvico-vaginais no Papanicolaou, identificar lesões pré-neoplásicas, infecções latentes ou subclínicas e relacionar o tipo viral envolvido na infecção. O presente estudo também reforça a grande importância de que estados e municípios programem e definam estratégias para o aumento de cobertura de exames citopatológicos periodicamente, especialmente nos grupos de maior vulnerabilidade sócio educacional, fazendo desta forma, um controle de qualidade dos exames e utilizando ações de educação sexual para realizar-se programas de prevenção de infecção pelo HPV.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
2. Pinto VFC, Barbosa VFC, Paiva SG. Aspectos epidemiológicos e citológicos de infecções pelo papilomavirus humano (HPV) em adolescentes: uma revisão. Revista Científica do ITPAC. 2012Oct;5(4).
3. Lima SF Jr, Fernandes MC, HeráclioSde A, de Souza PR, Maia Mde M. Prevalência de genótipos de papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. RevBrasGinecol Obstet. 2011 Oct;33(10):315-20.
4. Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
5. Oliveira MP, Passos DAC, Pereira CM, Alves VF. A associação entre o vírus HPV e o desenvolvimento do carcinoma

- de colo uterino. *Revista de Biotecnologia e Ciências*. 2012Dec;2(1):83-92.
6. Maragon VM, Guelsin GAS, Visentainer JEL, Borelli SD, Watanabe MAE, Consolaro MEL, Ferracioli KRC, Rudnick CCC, Sell AM. The association of the immune response genes to human papillomavirus-related cervical disease in a brazilian population. *BioMed Research International*. 2013 Jun.
 7. Afonso LA, Rocha WM, Carestiatto FN, Dobao EA, Pesca LF, Passos MRL, Cavalcanti SMB. Human papillomavirus infection among sexual partners attending a Sexually Transmitted Disease Clinic in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013 May;46(6):533-538.
 8. Kaneshima EN, Bidoia CCG, Gabriel M, Suzuki LE, Consolaro MEL. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. *ActaScientiarum*. 2001;23(3):731-737.
 9. Mahony JB, Coombes BK, Chernesky MA. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J. Clin. Microbiol*. 1993;31:1753-1758.
 10. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Woliinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *CancerCells*. 1989;7:209-214.
 11. Grce M, Husnjak K, L Magdic, Ilijas M, Zlacki M, Lepusić D, Lukac J, Hodek B, Grizelj V, Kurjak A, Kusic Z, Pavelić Detecção K. e digitação de humano papilomavírus por reação em cadeia da polimerase em arranhões cervicais de croata mulheres com citologia anormal. *Eur J Epidemiol*. 1997 Sep;13(6):645-51.
 12. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Infecção pelo papilomavírus humano genital entre universitárias como determinada por um método baseado em PCR. *JAMA*. 1991 Jan;265(4):472-7.
 13. Crosignani P, De Stefani A, Fara GM, Isidori AM, Lenzi A, Liverani CA, Lombardi A, Mennini FS, Palu' G, Pecorelli S, Peracino AP, Signorelli C, Zuccotti GV. Towards the eradication of HPV infection through universal specific vaccination. *BMC Public Health*. 2013 Jul;11:13:642.
 14. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. [Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women]. *RevSaude Publica*. 2002 Feb;36(1):95-100.
 15. Oliveira GR, Vieira VC, Barral MF, Döwich V, Soares MA, Concalves CV, de Martinez AM. [Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Basic Unidades de saúde de um Hospital Universitário do Sul do Brasil]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2013 May;35(5):226-32.
 16. Sanjosé S, M Diaz, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Prevalência mundial e distribuição genotípica do vírus do papiloma humano cervical DNA em mulheres com citologia normal: uma meta-análise. *Lancet InfectDis*. 2007 Jul;7(7):453-9.
 17. Fedrizzi EM, Schlup GC, Menezes ME, Ocampos M. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2008;20(2):73-79.
 18. Oliveira GR, Vieira VC, Barral MF, Döwich V, Soares MA, Concalves CV, de Martinez AM. [Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Basic Unidades de saúde de um Hospital Universitário do Sul do Brasil]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2013 May;35(5):226-32.
 19. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. [Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women]. *RevSaude Publica*. 2002 Feb;36(1):95-100.
 20. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 May.
 21. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 March;98(2):181-4.
 22. Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Gibbons L, Picconi MA. HPV tipo específico prevalência em lesões de câncer e de alto grau do colo do útero na América Latina e no Caribe: revisão sistemática e meta-análise. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e25493.
 23. Freitas TP, Carmo BB, Paula FD, Rodrigues LF, Fernandes AP, Fernandes PA. A detecção molecular de HPV 16 e 18 em amostras cervicais de pacientes de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007 Sep-Oct; 49 (5):297-301.
 24. Ayres ARG, Silva GA. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. *Revista de Saúde Pública*. 2010 Feb;44(5):963-74.
 25. Fernandes APM, Gonçalves MAG, Simões RT, Quintana SM, Duarte G, Donadi EA. Influência da infecção pelo HIV-1 sobre a presença do HPV em lesões do colo uterino. *DST – J Bras Doenças Sex Transm*. 2004;16(1):21-5.
 26. Bringhenti MEZ, Dozza TG, Dozza TG, Martins TR, Bazzo ML. Prevenção do câncer cervical: associação da citologia oncológica a novas técnicas de biologia molecular na detecção de papilomavírus humano (HPV). *DST – J Bras Doenças Sex Transm*. 2010;22(3):135-40.