



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Renata Mirian Nunes Eleutério**

**Prevalência de Papilomavírus humano em adolescentes  
virgens e com vida sexual ativa**

Rio de Janeiro

2010

Renata Mirian Nunes Eleutério

**Prevalência de Papilomavírus humano em adolescentes  
virgens e com vida sexual ativa**

Dissertação apresentada, como requisito parcial pra obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

E39 Eleuterio, Renata Mirian Nunes .  
Prevalência de papilomavirus humano em adolescentes virgens  
e com vida sexual ativa / Renata Mirian Nunes Eleuterio. - 2010.  
39 f. : il.

Orientador: Marco Aurélio Pinho de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adolescentes - Teses. 2. Adolescentes(Meninas) - Teses. 3.  
Vírus do papiloma - Teses. 4. Biologia molecular - Teses. 5. Sonda  
DNA - Teses. I. Oliveira, Marco Aurélio Pinho de. II. Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III.  
Título.

CDU 618.146-006.52-055.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese,  
desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Renata Mirian Nunes Eleutério

**Prevalência de Papilomavírus humano em adolescentes virgens  
e com vida sexual ativa**

Dissertação apresentada, como requisito parcial pra obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de maio de 2010.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Pinho de Oliveira

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mary Rangel  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Hildoberto Carneiro de Oliveira  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Professor Doutor José Carlos de Jesus Conceição  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2010

## DEDICATÓRIA

À minha família, pelo exemplo profissional e pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador, pela ajuda e oportunidade de dar mais este passo na minha carreira profissional.

À Dra Cláudia Jacyntho, pela idéia central desta tese, assim como o auxílio em todo o processo, além de outros projetos que instigam e me inspiram a cada dia.

À Dra Josele Rodrigues de Freitas, pela imensa ajuda em seu Ambulatório, assim como sua amizade, um dos grandes presentes do Rio de Janeiro em minha vida.

Aos professores que tive a honra de conhecer e aprender de maneira detalhada mais temas e assuntos de interesse. Aos colegas de aprendizado pelo apoio e motivação, especialmente Maristela. A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Médicas, pela função que cada um exerce para que tenhamos nosso Curso, em especial a Jaciara.

À minha família e amigos, por entender meus anseios e me dar suporte no Rio de Janeiro, além de acreditar e lutar comigo. Ao meu marido, pela força desde o processo de seleção até a defesa, compreendendo minha ausência em alguns momentos para concluir este trabalho.

A todos que de maneira direta ou indireta participaram desta tese.

“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”

*Sócrates*

## RESUMO

ELEUTERIO, Renata Mirian Nunes. *Prevalência de HPV em adolescentes virgens e com atividade sexual*. 2010. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA bastante prevalente em estimativas mundiais, sendo a DST isolada mais freqüente no mundo. Existem poucos dados sobre prevalência em adolescentes sem vida sexual ativa, havendo ainda muitos tabus nesta faixa etária. O presente estudo tem por objetivo identificar a prevalência de Papilomavírus humano através de biologia molecular em pacientes sem coitarca, comparando com um grupo de pacientes da mesma faixa etária com atividade sexual. Foram avaliadas 100 adolescentes com idade variando de 11 a 20 anos, com pelo menos dois anos pós-menarca, atendidas no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2009 no ambulatório de ginecologia infantopuberal do Hospital Universitário Pedro Ernesto. Das 100 adolescentes, 50 apresentavam hímen íntegro e 50 relatavam atividade sexual regular. Para as pacientes sem coitarca (grupo 1) foi realizada uma coleta apenas de vestíbulo e para as pacientes com atividade sexual (grupo 2) foi realizada coleta de vagina e endocérvice. A pesquisa de DNA-HPV foi realizada por captura híbrida de 2ª geração. Os resultados foram descritos em unidade relativa de luz. Para os dados categóricos foram aplicados os testes exato de Fisher. A positividade geral de DNA de HPV de alto e de baixo risco foi de 72%. No grupo 1 houve positividade do teste em 3 casos (6%). Já no grupo 2, 33 casos (66%) foram positivos para pelo menos um sítio. Material de vagina foi positivo em 30 casos (60%) e de colo em 27 casos (54%). Pode-se concluir que a positividade nas meninas com vida sexual ativa é alta. A infecção pelo HPV, ainda que pouco frequente, pode estar presente em meninas sem coitarca.

Palavras-chave: Adolescente, Virgem, Biologia Molecular, Sondas DNA, HPV



## ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is a DNA virus with high prevalence worldwide. It is the single most common STD in the world. There are few data on prevalence among adolescents not sexually active and there are many taboos in this age group. The aim of this study is to identify the prevalence of HPV by molecular biology in patients without first sexual intercourse compared with a group of patients of similar age with sexual activity. We evaluated 100 adolescents aged 11-20 years with at least two years post-menarche, attended from January 2007 to January 2009 at the gynecology outpatient clinic for children and pubertal at the University Hospital Pedro Ernesto. Among the 100 adolescents, 50 had intact hymen and 50 reported regular sexual activity. For patients without first sexual intercourse (group 1) we collected material from vestibule only and for patients with sexual activity (group 2) we collected material from vagina and endocervix. The search for HPV DNA was performed by 2nd generation hybrid capture. The results were reported in relative light units. For the categorical data we applied Fisher's exact test. The overall positivity of HPV DNA of high and low risk was 72%. In group 1 test was positive in 3 cases (6%). In the second group, 33 cases (66%) were positive for at least one site. Material from vagina were positive in 30 cases (60%) and cervix in 27 cases (54%). We can conclude that the positivity in girls with sexual activity is high. HPV infection, although rare, may occur in girls without sexual intercourse.

Keywords: Adolescent, Virgin, Molecular Biology, DNA Probes, HPV

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Esquematização do genoma do HPV (Fonte: Muñoz et al., 2006)	03
Figura 02. Árvore filogenética (Fonte: de Villiers et al., 2004)	06
Figura 03. Ilustração do tecido normal e infectado (Fonte: Frazer, 2004)	08
Figura 04. Metaplasia imatura na citologia (Fonte: Eleutério Jr, 2003)	11
Figura 05. Metaplasia imatura na histologia (Fonte: Eleutério Jr, 2003)	11
Figura 06. Hiperplasia de células de reserva na histologia (Fonte: Eleutério Jr, 2003)	12
Figura 07. Fases da técnica de captura híbrida (Fonte: Digene, 2006)	17

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1. Pesquisa de DNA-HPV conforme o sítio.	23
Gráfico 2. Pesquisa de DNA-HPV concordante conforme o sítio	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sociodemográficos	20
Tabela 2. Pesquisa de DNA-HPV no grupo 1	21
Tabela 3. Dados sociodemográficos das pacientes do grupo 1	21
Tabela 4. Pesquisa de DNA-HPV de alto e baixo risco na coleta vaginal nos grupos 1 (sem coitarca e com hímen íntegro) e 2 (com atividade sexual)	22
Tabela 5. Presença de DNA-HPV segundo classificação e sítio no grupo 2	22
Tabela 6. Coinfecção de vagina e colo com o mesmo grupo de vírus	24
Tabela 7. Correlação entre as variáveis sociodemográficas e a positividade no teste DNA-HPV no grupo 2	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-VLP	Partículas semelhantes ao vírus ( <i>virus like particles</i> )
BPV-1	Papilomavírus bovino tipo 1
CEP	Comitê de ética e pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-HPV	Ácido desoxirribonucléico do papilomavírus humano
DST	Doença sexualmente transmissível
E1-E7	Genes precoces
hC2v2	Captura híbrida de 2ª geração versão 2
HPV	Papilomavírus humano
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
ICTV	Conselho de Taxonomia de Vírus ( <i>Council on the Taxonomy of Viruses</i> )
L1/L2	Genes tardios, responsáveis pelas proteínas do capsídeo viral
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pRB	Proteína do retinoblastoma
RLU	Unidade relativa da luz
RNA	Ácido ribonucléico
STM	Solução presente nos tubetes para transportar as amostras coletadas ( <i>specimen transportation médium</i> )
URR	Região regulatória ( <i>upstream regulatory region</i> )

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
1	<b>O PAPILOMAVÍRUS HUMANO – HPV</b> .....	02
1. 1	<b>Biologia do HPV</b> .....	02
1. 2	<b>Classificação</b> .....	05
1. 3	<b>Cofatores</b> .....	07
1. 4	<b>Ciclo biológico</b> .....	07
1. 5	<b>Manifestações clínicas</b> .....	09
1. 6	<b>Epidemiologia</b> .....	09
1. 7	<b>Adolescente</b> .....	10
1. 8	<b>Meios de transmissão da infecção por HPV</b> .....	12
1. 8.1	<u>Transmissão não sexual</u> .....	12
1. 9	<b>Diagnóstico</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	19
4	<b>RESULTADOS</b> .....	20
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30

## INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA extremamente prevalente em todo o mundo. Atualmente existem mais de 200 tipos identificados, dos quais cerca de 45 são anogenitais, classificados como de alto e baixo risco, dependendo da sua associação com câncer genital (CLIFFORD ET AL., 2003).

Atualmente, a infecção por HPV é considerada a doença sexualmente transmitida (DST) de origem viral mais freqüente no mundo, havendo em torno de 300 a 400 milhões de novas infecções, onde a maioria dos casos se apresenta na forma latente, sem indicativos clínicos da infecção. Este fato se faz muito importante pela questão da transmissibilidade (PARKIN ET AL., 2005).

O HPV tem em sua essência enigmas ainda não totalmente esclarecidos. A possibilidade de infecção por transmissão não sexual não é bem definida ainda. Há muita discussão quanto ao papiloma de laringe e a transmissão perinatal, assim como infecção através da placenta e cordão umbilical (TSENG ET AL., 1998; MEDEIROS ET AL., 2005; SARKOLA ET AL., 2008). Além destas, a transmissão por auto-inoculação, de mãos para genitais, bem como por fômites, estaria associada a possível via não sexual, uma vez que estudos demonstram a possibilidade de manutenção de infectividade em temperatura ambiente (FERENCZY ET AL., 1989; RODEN ET AL., 1994; HERNANDEZ ET AL., 2008).

Embora se saiba da alta prevalência de infecções pelo HPV entre adolescentes com atividade sexual, onde a ectopia expõe células jovens (células parabasais e de reserva) mais receptivas à infecção pelo vírus, a maioria destas infecções tende a desaparecer espontaneamente, sendo transitórias (MOSCICKI, 2007). No entanto, poucos estudos têm conseguido demonstrar a presença do vírus entre meninas antes da coitarca (SHIN ET AL., 2003; BEZNOS ET AL., 2006; FREGA ET AL., 2003).

## 1 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO - HPV

O HPV pertence ao grupo *Papovaviridae*, família *Papillomaviridae*, gênero alfa, beta, gama...-*papillomavirus* e é capaz de infectar animais e homens. São vírus epiteliotrópicos, podendo induzir vários tipos de lesões. (BERNARD, 2005)

Existem mais de 200 tipos de HPV descritos na literatura, dos quais em torno de 45 têm tropismo genital, que por sua vez podem ser divididos em tipos de alto risco e de baixo risco, conforme sua associação com carcinoma cervical:

- ✓ Baixo risco (Grupo A), que compreende principalmente os tipos 6, 11, 42, 43 e 44.
- ✓ Alto risco (Grupo B), que engloba os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

Os tipos mais encontrados são os de alto risco, principalmente o tipo 16 (MUÑOZ ET AL., 2003).

A infecção do HPV de alto risco representa o fator de risco mais importante na gênese do carcinoma de colo uterino. Estudos caso-controle indicam a presença do HPV associado ao câncer cervical com um risco relativo que varia ao redor de 50 a 150 para os chamados genótipos virais de alto risco, principalmente os mais prevalentes, 16 e 18. O tipo de HPV 16, de alto risco oncogênico, foi considerado pela IARC (*Internacional Agency for Research on Cancer*) como definitivamente carcinogênico para a raça humana (BURD, 2003; IARC, 1995).

### 1. 1 Biologia do HPV

O HPV possui um genoma de DNA de dupla fita, circular, não envelopado, possuindo uma simetria icosaédrica, constituído por cerca de 8000 pares de bases. O material genético é envolto por um capsídeo de 50nm de diâmetro, que possui 72 subunidades denominadas capsômeros. Os capsômeros são formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2. A proteína L1 é a principal, formadora do capsídeo viral, representando 80% da proteína do HPV e é gênero-específica, enquanto a L2 é tipo-específica (BROWN ET AL., 1993; MODIS ET AL., 2002).

O genoma do HPV está dividido em três regiões conhecidas como *Open reading frames* ou unidades de tradução (ORFS) e como genes que codificam as



proteínas virais que se localizam em uma mesma fita de DNA. A região L (de *late*) é composta por *loci* L1 e L2, responsáveis pela fase final do ciclo celular. A região E (de *early*) é composta por *loci* E1, E2, E4-E7, necessários para a replicação do DNA viral e eventuais ações transformadoras nas células hospedeiras. E a URR (*upstream regulatory region*) é responsável pela regulação da expressão dos genes, replicação genômica e envelopamento das partículas virais (DE VILLIERS ET AL., 2004; MUÑOZ ET AL., 2006) (Figura 1).

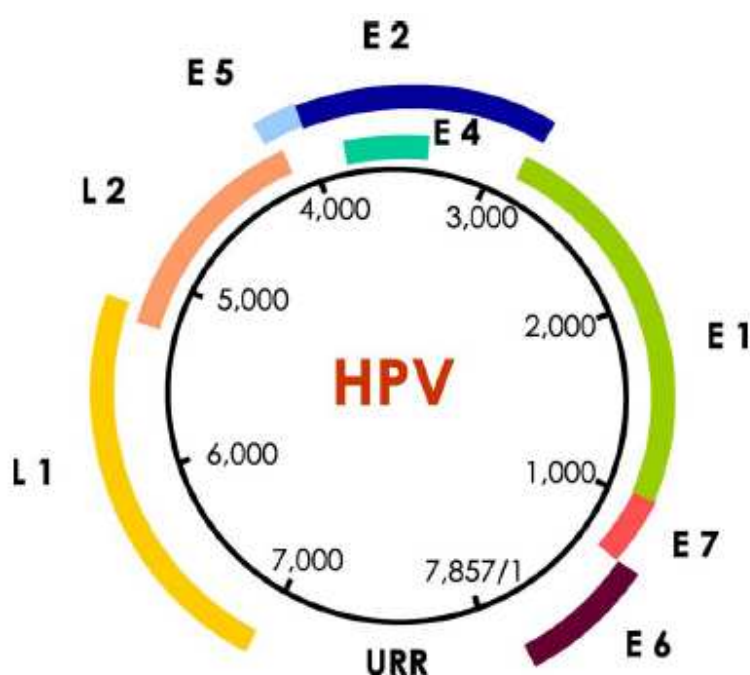


Figura 1. Esquemática do genoma do HPV (Fonte: MUÑOZ ET AL., 2006).

As proteínas virais codificadas pelos genes E1 e E2 são essenciais para a replicação de DNA. Possivelmente durante a persistência viral o sistema imune permite a manutenção da infecção neste estágio. Depois, uma vez que as células basais passam para a camada parabasal, elas perdem a habilidade de se dividir e iniciam processo de diferenciação. O HPV se replica neste compartimento e evolui para desintegração das células epiteliais infectadas mais maduras, na camada superficial, para liberação no ambiente. A proteína codificada por E2, além de controlar a transcrição de E6 e E7, parece possuir atividade estimuladora da função da proteína supressora de p53 (DOORBAR, 2006). Em estudo mais recente é possível observar a sua função direta nas etapas iniciais de transformação mediada por HPV (BELLANGER ET AL., 2010).

Já a proteína E4 pode ser detectada nas camadas mais diferenciadas do epitélio infectado, durante o ciclo produtivo viral. Alguns pesquisadores acreditam que sua função esteja ligada à desestabilização de citoqueratinas e concomitantemente das redes destas proteínas, sendo responsável pela modificação na arquitetura celular, de forma que o rompimento da célula levaria a uma liberação de partículas virais. (PALEFSKY, 1991; ROBERTS 1997; NAKAHARA ET AL., 2002).

O gene E5 do HPV 16 contribui para a carcinogênese cervical por inibir a apoptose de células epiteliais cervicais infectadas e é necessário e suficiente para a formação de células binucleadas, uma característica comum de lesões pré-cancerosas do colo do útero, que surgem por fusão celular. Com a coexpressão de HPV16 E6/E7 há o aumento da proliferação destas células. (OH ET AL., 2010; HU ET AL., 2009).

Os genes E6 e E7 induzem proteínas homônimas, que são as principais transformadoras do HPV e estão diretamente envolvidas na indução de proliferação benigna e transformação maligna nas células do hospedeiro. Geralmente o câncer se desenvolve como consequência de alterações genéticas com ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os mais assiduamente estudados nas relações do HPV com seu potencial oncogênico têm sido o p53 (inativado por E6) e o Rb (destruído por E7). O papel dos produtos destes genes é regular o ciclo celular por controle da transcrição de genes celulares envolvidos na progressão do ciclo e na proliferação celular (ELEUTÉRIO ET AL., 2007; MCLAUGHLIN-DRUBIN E MUNGER, 2009; GANGULY E PARIHAR, 2009; GHITTONI ET AL., 2010).

A proteína expressa por E6 é uma proteína nuclear formada por 150 aminoácidos e se liga ao produto do gene p53, levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. O gene p53 é um supressor tumoral já que a proteína p53 tem como função a regulação do ciclo celular. Então E6 promove a degradação da proteína p53 e desregula este controle (ZUR HAÜSEN, 2000; BUITRAGO-PÉREZ ET AL., 2009; YUGAWA E KIYONO, 2009).

O produto do gene E7 é uma fosfoproteína com cerca de 100 aminoácidos que se liga à forma hipofosforilada da proteína celular pRB. A pRB é produto do gene do retinoblastoma, que é um supressor de tumor. A proteína E7 se liga às

proteínas que controlam o ciclo celular como a pRB, p107, p130 e ciclina A, promovendo, desta forma, a proliferação e imortalização das células. A ligação de E7 à pRB inativa a função de pRB, que é regular negativamente o ciclo celular. As proteínas E7 de HPV de alto risco oncogênico se ligam com maior afinidade em pRB do que os HPV de baixo risco oncogênico (ZUR HAÜSEN, 2000; BUITRAGO-PÉREZ ET AL., 2009).

Os genes L1 e L2 codificam proteínas que são conservadas em todos os papilomavírus e são expressadas nas camadas superficiais do epitélio. O L2 codifica proteína do capsídeo do HPV que desempenha papel importante na entrada do vírus nas células, na localização de componentes virais no núcleo, na ligação do DNA, na formação do capsídeo e estabilidade viral e celular. (ZUR HAÜSEN, 2000; MUÑOZ ET AL., 2006).

## 1. 2 Classificação

O *International Council on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) reconheceu o HPV como sendo um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, gênero *papillomavirus* Alfa, Beta, Gama e outros, sendo o Alfa o mais importante clinicamente, pois contém os tipos associados às lesões da mucosa genital (Figura 2) (DE VILLIERS ET AL., 2004).

A classificação em tipos de HPV é feita com base na homologia das seqüências de DNA, onde as variações no genoma dos genes L1, E6 e E7 menores que 2% são consideradas variantes, variações entre 2 e 10% são subtipos, e maiores que 10% são considerados novos tipos de HPV. As numerações foram dadas de acordo com a ordem em que foram identificados, sendo o HPV1 o primeiro, e assim por diante (BERNARD ET AL., 1994).

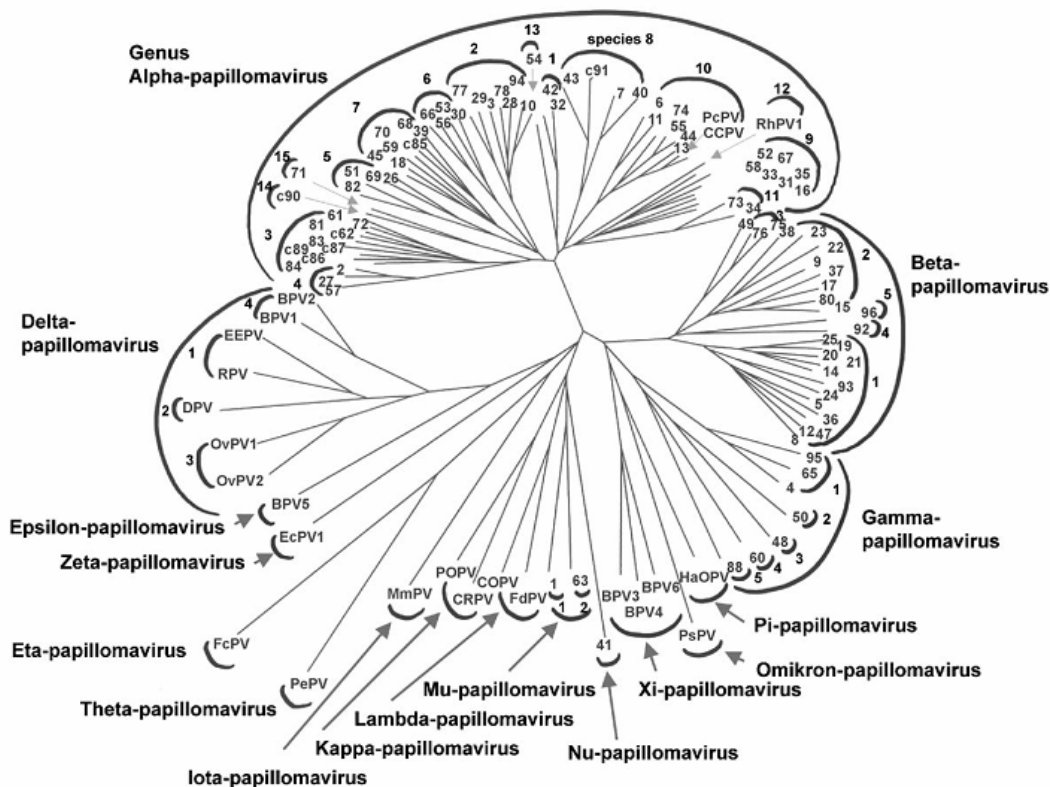


Figura 2. Árvore filogenética (Fonte: DE VILLIERS ET AL., 2004)

Dos mais de 200 tipos descritos na literatura, cerca de 100 foram identificados, com seus genomas isolados e seqüenciados. Destes, mais de 40 infectam regiões anogenitais, onde alguns tipos estão associados com o câncer de colo, de acordo com seu potencial oncogênico (BERNARD, 2005).

Os tipos de HPV que infectam o trato genital podem ser divididos em dois grupos. O primeiro é o grupo de baixo risco oncogênico, onde os seus tipos ocorrem mais freqüentemente em lesões benignas, lesões intraepiteliais de baixo grau e raramente são encontradas em lesões cancerosas. São os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108, além de outros ainda não publicados. O segundo grupo é o de alto risco oncogênico, que ocorre geralmente em lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas. São os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 e outros ainda não identificados (MUÑOZ ET AL., 2003).

### 1.3 Cofatores

A maioria das infecções por HPV, mesmo causadas pelos tipos de alto risco oncogênico, não necessariamente leva ao desenvolvimento de câncer cervical. A infecção por HPV de alto risco é necessária, porém não é determinante. Neste momento os fatores deflagradores serão aqueles que atuam juntamente com o HPV influenciando no risco de transição entre a infecção para uma neoplasia cervical propriamente dita. Existem fatores ambientais e/ou próprios do hospedeiro, como os hormônios, em que podemos citar a progesterona e sua ação *in vitro* sobre a LCR viral estimulando a transcrição de HPV 16 (MAGNUSSON ET AL., 2000).

O cigarro também é considerado cofator por ser agente mutagênico e causar imunodeficiência local. Alguns estudos conseguem mostrar um maior risco para as pacientes positivas para HPV e que são fumantes, assim como o aumento de fumantes desde a adolescência também é um fator importante (KJELLBERG ET AL., 2000; HILDESHEIM ET AL., 2001; CASTELLSAGUÉ ET AL., 2002; PLUMMER ET AL., 2003).

O polimorfismo genético tem sido bastante debatido e poderia justificar a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias (BHATTACHARYA E SENGUPTA, 2007). Outros fatores que também podem influenciar na progressão da infecção do HPV são a alta paridade, uso prolongado de anticoncepcionais orais e outros agentes sexualmente transmissíveis (HILDESHEIM ET AL., 2001; CASTELLSAGUÉ ET AL., 2002).

### 1.4 Ciclo biológico

O HPV é um organismo exclusivamente intracelular que infecta as células mitoticamente ativas para se estabelecer no epitélio. Por isso, os carcinomas se originam na junção escamocolunar e na zona de transformação, pois neste local há acesso imediato às células de reserva e células basais e parabasais do epitélio metaplásico (RONCO, 1999).

O ciclo de vida é dependente da diferenciação do epitélio infectado. O vírus infecta inicialmente as células basais, que estão ativamente em divisão celular. O DNA viral é mantido em um pequeno número de cópias dentro dos núcleos das células infectadas até que sofram diferenciação e sejam movidas à superfície do

epitélio. Ao final desta diferenciação há um número elevado de cópias virais e os genes tardios ou da região L (*late*) são expressos (FERENCZY E FRANCO, 2002).

Os vírions do HPV infectam as células epidérmicas germinais na camada basal, e estas não permitem a replicação do vírus. Então, à medida que as células germinais se dividem e vão para a superfície, irão disseminar o vírus para as células irmãs, que se transformam e proliferam de maneira displásica. A camada celular fica mais espessa e cada célula fica vacuolizada. A aparência da verruga, que se observa em lesões clínicas, deve-se à proliferação celular. As células infectadas passam por uma diferenciação, queratinização e há replicação viral. Os vírions infectantes serão liberados podendo infectar as células próximas, explicando o fato de as verrugas serem contagiosas (PEREZ, 2001; FRAZER, 2004).

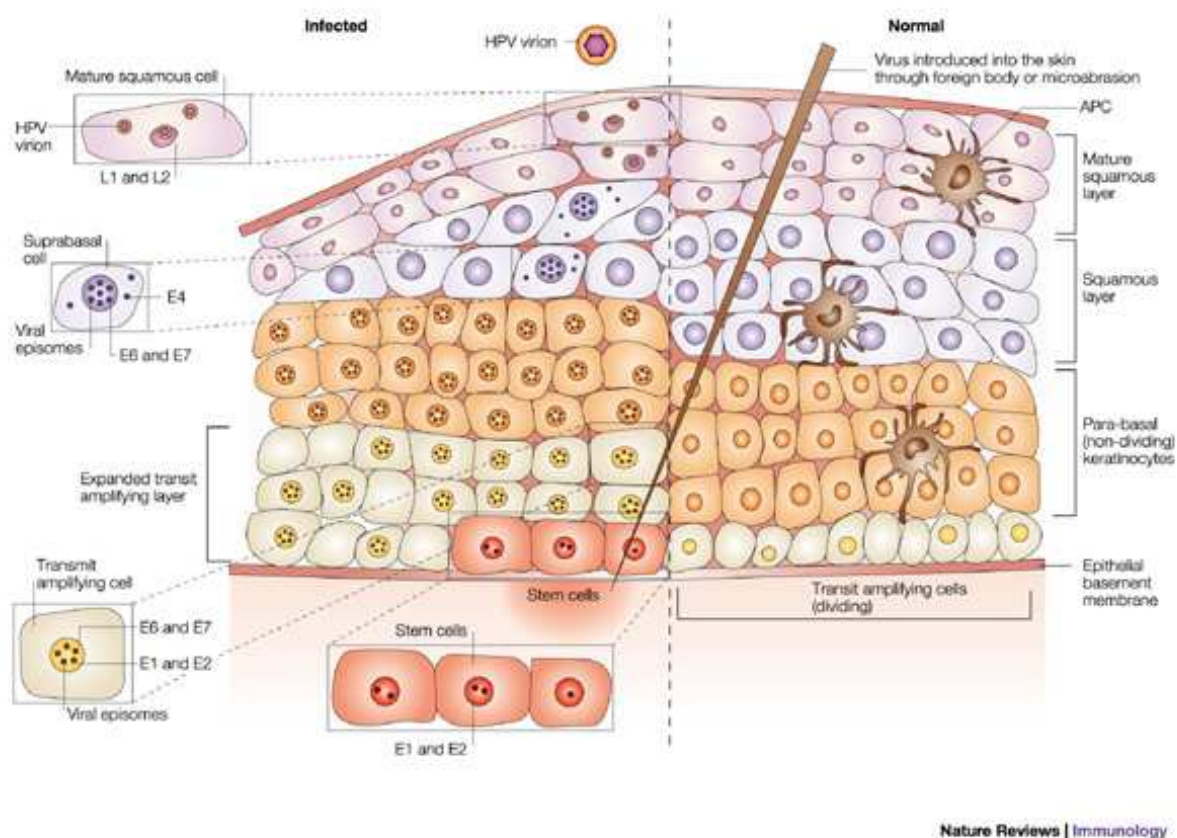


Figura 3. Ilustração do tecido normal e infectado (Fonte: FRAZER, 2004).

Durante o período de incubação há uma interação epissômica em que há a também interação da célula com o vírus, que é regulada pelos cofatores. A infecção epissômica pode ocorrer em locais de microtraumas, onde os vírions penetram, modificando a conformação das proteínas do capsídeo. A infecção viral pode

permanecer sem manifestação ativa da doença, como acontece com a maioria dos infectados. Quando há a doença ativa há uma proliferação ativa que pode durar de 3 a 6 meses, onde se observa o crescimento da camada basal, replicação viral nas camadas médias e os efeitos citopáticos nas células superficiais. Estas alterações podem levar às lesões de verrugas clássicas ou lesões subclínicas, como lesões acetobranças na colposcopia. Mas, a forma de interação mais importante em termos de carcinogênese é de integração do vírus no genoma celular que pode interferir na síntese protéica levando a alterações pré-neoplásicas e neoplásicas. Na grande maioria das vezes os quadros são latentes, mas alguns levam a lesões subclínicas diagnosticadas apenas por métodos de magnificação (microscopia e genitoscopia) (ZUR HAÜSEN, 2000).

### **1. 5 Manifestações clínicas**

A infecção por HPV pode ser classificada como latente, clínica, subclínica. Na forma latente é possível detectar o vírus apenas por técnicas de biologia molecular através da identificação do DNA do HPV, não sendo possível alterações nem citológicas, nem histológicas, nem colposcópicas. Na forma subclínica somente é possível visibilizar as lesões induzidas com o auxílio do colposcópio, enquanto que a manifestação clínica é mais facilmente observada, no caso os condilomas acuminados que são lesões papilares que podem ser encontradas na região anogenital (JACYNTHO, 2001; BURD, 2003).

### **1. 6 Epidemiologia**

A infecção cervical por HPV, atualmente, representa a doença sexualmente transmissível (DST) isolada mais freqüente no mundo. Apesar da alta prevalência, muitas infecções serão transitórias (60%), o que é extremamente comum em jovens, apresentando duração média de 8 a 10 meses. Entretanto, as infecções persistentes são encontradas em 5% a 10% das mulheres com 35 anos ou mais, associando-se com aumento do risco de progressão para neoplasia a partir das lesões HPV induzidas. (RAMA ET AL., 2006).

A infecção freqüentemente leva a microlesões, que são pouco ou nada visíveis sem auxílio óptico. Papilomavírus podem ficar latentes por longos períodos

de tempo em seu hospedeiro (ANTONSSON ET AL., 2000, 2003), podendo ser ativado em situações de imunodeficiência (JABLONSKA E MAJEWSKI, 1994; DE VILLIERS, 1998; FORSLUND ET AL., 2003).

A cada ano surgem em torno de 500.000 casos novos de câncer do colo do útero, dos quais em torno de 70% ocorrem em países em desenvolvimento. Também se estima que haja entre 10 a 20 vezes mais lesões precursoras desses tumores, o que implica em um contingente muito grande de indivíduos afetados (LINHARES E VILLA, 2006; CDC, 2010; INCA, 2010). O número de casos novos de câncer do colo do útero esperado para o Brasil no ano de 2010 será de 18.430, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na Região Norte (23/100.000). Nas regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000), ocupa a segunda posição mais freqüente e nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000), a terceira posição (INCA, 2010).

## **1.7 Adolescente**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a adolescência compreende a faixa etária que vai dos 10 aos 19 anos. Já para a Organização das Nações Unidas (ONU), a faixa etária da adolescência é entre 15 e 24 anos. É uma fase caracterizada por mudanças físicas aceleradas e características da puberdade, diferentes do crescimento e desenvolvimento que ocorrem em ritmo constante na infância. Essas alterações surgem influenciadas por fatores hereditários, hormonais, ambientais, nutricionais e psicológicos (OMS, 2010).

Na adolescência há uma grande exposição da junção escamocolumnar e, em especial do epitélio cilíndrico endocervical (ectopia), com defesas limitadas a agressores. Pelo crescente aumento de níveis de esteróides sexuais, há um estímulo do trato genital inferior, levando à ectopia, ao que se segue uma hiperplasia das células de reserva subcolunares totipotenciais, que evolui para metaplasia imatura, que consiste de células jovens expostas na superfície epitelial e que seria uma porta de entrada para o HPV (Figuras 4-6). Infecções latentes e subclínicas são mais comuns na adolescência do que em adultas. A maioria destas infecções tende a desaparecer espontaneamente, sendo transitórias. Há uma grande importância à persistência do HPV de alto risco, que ao ocorrer por mais que um ano levaria a um



risco 14 vezes maior de uma lesão intraepitelial escamosa de alto grau em sua evolução (MOSCICKI, 2007).

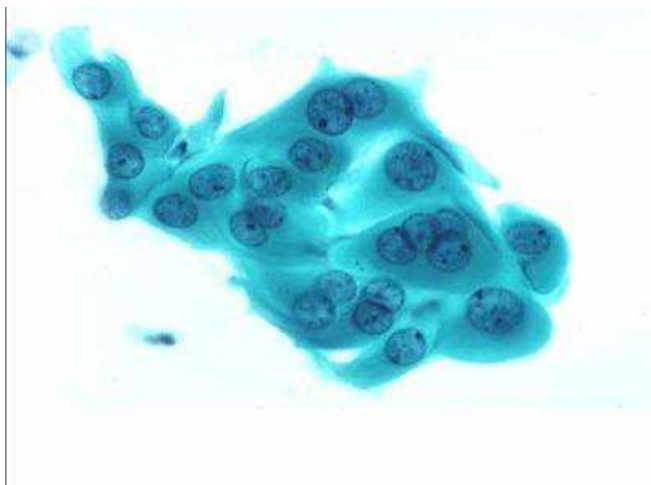


Figura 4. Metaplasia imatura na citologia (Fonte: ELEUTÉRIO JR, 2003).

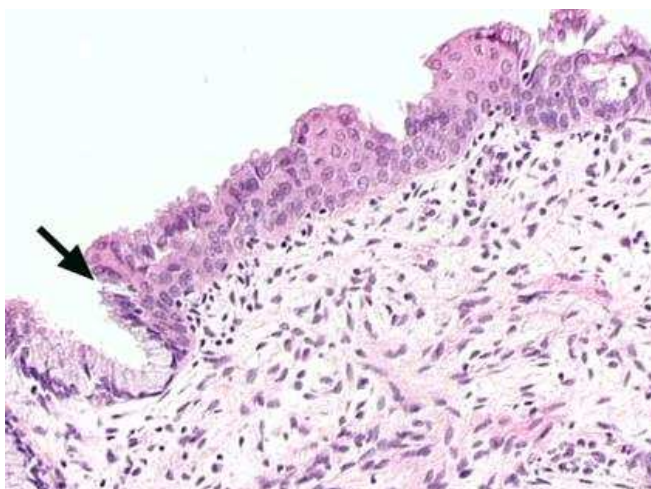


Figura 5. Metaplasia imatura na histologia (Fonte: ELEUTÉRIO JR, 2003).

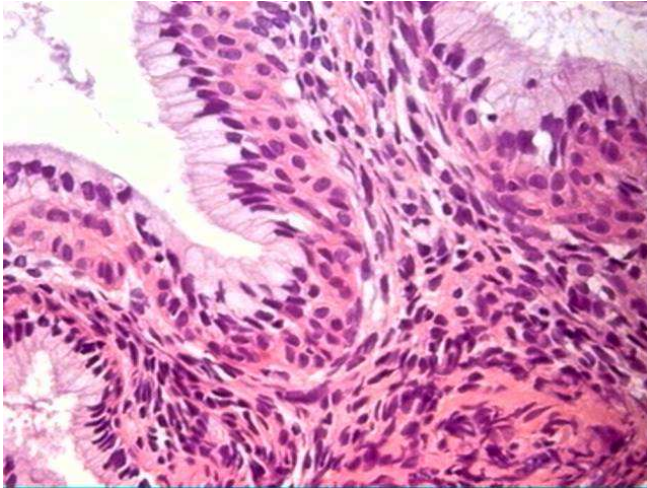


Figura 6. Hiperplasia de células de reserva na histologia (Fonte: ELEUTÉRIO JR, 2003).

## 1. 8 Meios de transmissão

A transmissão de HPV é considerada como predominantemente sexual, porém alguns estudos sugerem que pode haver transmissão pelo contato da pele com fômites, por auto-inoculação, assim como perinatal (FERENCZY ET AL., 1989; OBALEK ET AL., 1993; FREGA ET AL., 2003; SINAL E WOODS, 2005; FERIZZI ET AL., 2009).

### 1. 8. 1 Transmissão não sexual

A possibilidade de infecção por transmissão não sexual não está bem definida. A transmissão vertical da mãe para o filho durante o parto é bastante discutida. Embora o abuso sexual deva ser investigado nos casos de condilomas anogenitais em crianças, existem casos em que são adquiridos via perinatal (SINAL E WOODS, 2005). Já existem relatos de condiloma acuminado em crianças, cuja transmissão foi não-sexual, da mãe infectada para o bebê (FERIZI ET AL., 2009).

A taxa de positividade para DNA do HPV em amostras de recém-nascidos não indica infecção, podendo apontar apenas contaminação por material materno infectado. (TSENG ET AL., 1998; MEDEIROS ET AL., 2005).

Outra via bastante discutida é a transmissão intra-útero, através de uma infecção ascendente ou transplacentária. No estudo realizado por Sarkola et al. (2008), DNA de HPV foi detectado em 4.2 e 3.5% das amostras de placenta e

cordão umbilical respectivamente, incluindo os tipos de HPV 16, 6, 83 e 39. No Brasil, um estudo de casos de papilomas e papilomatoses vulvares congênitas em neo e natimortos demonstrou o envolvimento do HPV nestas lesões através de histopatologia e microscopia eletrônica (DIAS ET AL., 1995).

Nos casos de câncer de cabeça e pescoço, alguns autores consideram a via perinatal uma via de transmissão do HPV (CAMPISI E GIOVANNELLI, 2009).

No trabalho de Obalek et al. (1993), no qual se avaliaram crianças com idade entre 7 meses e 12 anos portadoras de verrugas anogenitais, foi constatada uma prevalência de 17,4% de HPV 2 (causadores da verruga comum) e 74% de HPV 6. Este trabalho enfatiza que a autoinoculação por parte de crianças portadoras de verrugas em mãos, ou heteroinoculação pode ser um modo de transmissão não-sexual.

A aquisição do HPV durante a infância e a adolescência não é uma causa imediata de morbidade grave, porém, há fortes evidências de que a exposição precoce aumente o risco para o câncer (MOSCICKI, 1996). A persistência de infecção com genótipos oncogênicos em uma minoria de infectados pode ser um forte fator de risco para posterior desenvolvimento de lesão intraepitelial escamosa de alto grau, o precursor de neoplasia cervical, o que geralmente ocorre após um longo período latente. Desconhece-se se há a doença em crianças cronicamente infectadas com HPV oncogênico. A presença de DNA-HPV em crianças assintomáticas, sua capacidade de infecção e doença ainda não são claras. É recomendado seguimento para crianças com verrugas anogenitais (associadas a HPV 6 e 11), embora não existam estudos longitudinais disponíveis para esclarecer se elas estão em risco de desenvolvimento de carcinoma ainda jovens (JAYASINGH E GARLAND, 2006). Estudo realizado com crianças com infecções de laringe e anogenital, observou positividade de HPV resultante de transmissão não-sexual (SINCLAIR ET AL., 2008). Também foi possível observar que há a transmissão dos parentes para crianças em estudo realizado por Rintala et al. (2005), onde a infecção persistente pelo HPV nas mães foi um fator de risco para o HPV oral nos filhos de 6 meses, e o HPV oral nas mães foi um fator de risco para o HPV genital dos filhos de alto risco. Assim, tanto o HPV cervical persistente como o HPV oral subclínico nas mães afetaram o risco do HPV nas crianças. A idade de 6 meses é um ponto crítico para os filhos adquirirem ou estarem livres do DNA-HPV de alto risco.

Estudos que abordaram adolescentes virgens mostram resultados discordantes. Shimada et al. (2007) realizaram um estudo em que 251 adolescentes foram negativas, enquanto Frega et al. (2003) encontraram lesões induzidas por HPV em 88 virgens, onde ele conclui que poderia justificar uma transmissão vertical, por fômites ou contato pele-pele. Shin et al. (2003) encontraram anticorpos contra *virus like particles* (anti-VLP) em pacientes virgens.

Ainda não é determinado se a infecção por HPV também pode ser transmitida indiretamente, através de fômites. Para avaliar esta possibilidade, a infecciosidade *in vitro* para HPV-16 (um modelo HPV de alto risco) após dessecação foi comparada papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1), conhecido por ser transmitido através de fômites. O vírus tinha resistência semelhante à dessecação em extratos celulares, mantendo cerca de 100%, 50%, e de 30% da infecciosidade quando desidratados por 1, 3, e 7 dias, respectivamente, à temperatura ambiente. Os vírus tipo HPV-16 e BPV em extratos celulares foram completamente inativados por tratamento em autoclave e susceptíveis a etanol a 70%, mas eram resistentes ao EDTA ou à incubação a 56°C durante uma hora. Estes dados sugerem que a propagação não-sexual HPV genital de alto risco por fômites é possível, mas estudos mais bem desenhados serão necessários para confirmar esta afirmativa. (RODEN ET AL., 1997).

Segundo Ferenczy et al. (1989) há a possibilidade de o DNA de HPV estar presente em objetos que são utilizados para o tratamento de infecções genitais pelo vírus, sendo identificado por hibridização em esfregaços colhidos em oito de 16 (50%) luvas cirúrgicas. Do mesmo modo, DNA-HPV foi encontrado em 23 de 62 (37%) e um de 62 (1,6%) pinças de biópsia, antes e após a esterilização em 30% da tintura Savlon por 30 minutos, respectivamente. O *cryoprobe test* de DNA-HPV foi positivo em cinco de 22 (23%) e um de 22 (4,5%) antes e depois da limpeza do material de etanol a 90% em 1 minuto, respectivamente. A taxa de positividade HPV DNA após a esterilização é baixa.

## 1. 9 Diagnóstico

Os métodos diagnósticos das lesões induzidas por HPV são morfológicos e incluem o exame clínico, a colposcopia, a citologia oncótica e a histologia. Já a identificação da infecção por HPV propriamente dita inclui os métodos biológicos, como as hibridizações moleculares de ácidos nucleicos, tipo *Southern Blot*, captura de híbridos, hibridização *in situ* e reação em cadeia de polimerase (PCR) (JACYNTHO ET AL., 2001, MUÑOZ ET AL., 2003; RAMA ET AL., 2006).

A PCR é considerada o padrão ouro e se baseia na repetição de ciclos de 3 etapas:

1) desnaturação do DNA: obtida mediante a brusca elevação da temperatura da amostra analisada para 95°C, por um minuto. Neste momento ocorre a separação da "cadeia dupla" de DNA;

2) anelamento ou hibridização: ocorre entre a cadeia original de DNA (agora já desnaturada em "cadeia simples") e a seqüência de oligonucleotídeos que se liga à região inicial do DNA a ser amplificado, aumentando o número de cópias. Estes oligonucleotídeos são denominados "iniciadores" ou *primers*. A temperatura ótima para esta hibridização inicial varia de 37 a 70°C, dependendo primariamente do comprimento dos *primers* e de sua seqüência de oligonucleotídeos;

3) extensão: a extensão da seqüência de nucleotídeos em continuidade com a cadeia "iniciadora" mediada pela DNA-polimerase termoestável ocorre a 72°C, por 1 a 2 minutos. Esta reação dá origem a cópias de nucleotídeos da matriz do DNA da amostra inicial, sendo ampliada a região limitada pelos dois extremos de ligação dos *primers* com a "matriz de DNA". Este ciclo é repetido 30 a 40 vezes, dando origem a um aumento do produto de amplificação conhecido como amplicon. Assim, ao final de n ciclos, a reação teve um número teórico máximo de  $2^n$  moléculas de DNA dupla fita, que são cópias exatas da região específica do DNA molde, que foi codificado pelos iniciadores (FEDRIZZI ET AL., 2004).

Em comparação com o PCR, que tem sensibilidade de 99% e especificidade de 98%, a captura híbrida demonstra sensibilidade de 91,7% e especificidade de 95,4% (CASTLE ET AL., 2002). O teste molecular de captura híbrida para HPV é capaz de detectar o DNA de 18 tipos virais que mais comumente infectam o trato anogenital (masculino e feminino), sendo esses divididos em grupos de baixo risco e alto risco. O teste de captura híbrida tem mostrado ter sensibilidade e especificidade

satisfatória para uso rotineiro na análise da quantidade de DNA do grupo viral do HPV de baixo e alto risco. Como o risco de câncer cervical invasivo na mulher está diretamente relacionado à presença de HPV persistente de alto risco, a pesquisa desses tipos virais por meio de métodos moleculares tem sido extremamente útil para o acompanhamento de mulheres com alterações citológicas indeterminadas. A maioria das infecções por HPV é transitória e, aproximadamente, 70% delas desaparecem no período de um ano (HO ET AL., 1998).

A técnica da captura híbrida utiliza anticorpos na captura dos híbridos que são detectados por quimioluminescência através da amplificação de sinal. Os espécimes contendo DNA hibridizam-se com o coquetel de sonda específico de RNA-HPV. Os híbridos RNA/DNA são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA/DNA. Híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA/DNA e são detectados por substrato quimioluminescente.

Esta técnica apresenta 5 fases distintas:

1. Desnaturação: Densaturação das proteínas, com separação das fitas de DNA.
2. Hibridização: Espécimes contendo DNA hibridizam-se com o coquetel de sonda específico de RNA-HPV.
3. Captura dos híbridos: Os híbridos RNA/DNA são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA/DNA.
4. Reação dos híbridos com o conjugado: Híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA/DNA e são detectados por substrato quimioluminescente. Várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas para cada anticorpo.
5. Detecção dos híbridos por quimioluminescência: Múltiplos anticorpos conjugados se ligam a cada híbrido capturado resultando na amplificação de sinal. A luz é emitida e medida em Unidade de Luz Relativa (RLU) no quimioluminômetro. A intensidade da luz emitida denota a presença ou ausência do DNA nos espécimes. A medida RLU igual ou acima do valor do *cut-off* indica a presença da seqüência específica de DNA-HPV no espécime. RLU menor que o valor do *cut-off* indica a ausência da seqüência de DNA-HPV ou que os níveis estão abaixo do limite de detecção do ensaio.

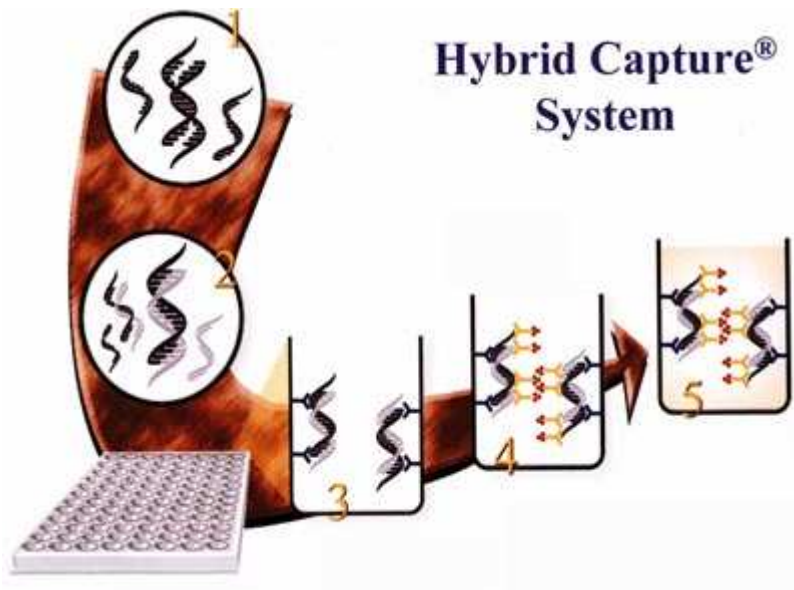


Figura 7. Fases da Técnica de Captura Híbrida. (Fonte: QIAGEN, 2010).

O ensaio conta com controles negativos e positivos, que são testados em triplicata. As leituras dos controles são utilizadas para a validação e o cálculo do *cut-off*. Para validação, sempre se deve observar os critérios abaixo:

- O coeficiente de variação das leituras entre os micropoços dos controles negativos e positivos não deve ultrapassar 25%.
- A divisão da média das leituras de RLU dos controles positivos pelos negativos deve ser superior a 2,0
- Os controles negativos devem respeitar o limite máximo de *background* de 250 RLU.

Há ainda dois outros controles intra-teste. O primeiro é quando se faz a adição do reagente de desnaturação. Todas as amostras devem tornar-se de cor roxa, isso dá a certeza de que todo material será desnaturado. O segundo, quando da adição das sondas, a coloração deve mudar de roxo para amarelo, assegurando que todas as amostras receberam a quantidade ideal de sonda (NONNENMACHER ET AL., 2002; QIAGEN, 2010).

## 2 OBJETIVOS

- **Objetivo geral**

Estudar a prevalência de infecção por HPV em grupo de adolescentes sem vida sexual e um grupo com vida sexual ativa.

- **Objetivos específicos**

Identificar a prevalência de infecção por HPV independente de não ter lesão morfológica

Fazer uma avaliação comparativa da prevalência com um grupo de adolescentes sexualmente ativas

Avaliar os dados sócio-demográficos para identificar possíveis fatores de risco que teriam associação com a infecção do HPV.



### 3 METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal com dados coletados prospectivamente entre janeiro de 2007 a janeiro de 2009, em 100 pacientes com idade variando de 11 a 20 anos, com pelo menos 2 anos pós-menarca, atendidas no ambulatório de ginecologia infanto-puberal do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que é um hospital que atende grande parte da população da cidade.

Foram criados dois grupos de estudo. O primeiro grupo (grupo 1) constituído por 50 pacientes que relatavam não ter tido relações sexuais e que apresentavam hímen íntegro ao exame físico, verificado por uma ginecologista com larga experiência em atendimento infantopuberal. Dados sociodemográficos foram anotados e para essas pacientes foi oferecida uma coleta de vestíbulo com “swab” específico e colocado em tubete coletor para preservação das amostras (*specimen transportation medium* [STM]).

Em um segundo grupo (grupo 2) foram avaliadas 50 pacientes sexualmente ativas, para as quais, também os dados sociodemográficos foram arrolados e foram oferecidas uma coleta vaginal e outra endocervical, com swabs e tubetes específicos com STM para cada sítio, realizados pela mesma ginecologista.

Foram excluídas do estudo pacientes com diagnóstico morfológico ou história de NIC e/ou HPV e câncer anogenital e adolescentes que tenham sofrido abuso sexual.

Os tubetes devidamente identificados foram enviados ao laboratório de biologia molecular para pesquisa de DNA-HPV (de alto risco e de baixo risco) por Captura Híbrida de 2ª geração versão 2 (hC2v2), conforme especificações do fabricante (Qiagen ®). Os resultados dos exames foram descritos em unidade relativa de luz (RLU), resultado da leitura da amplificação do sinal por quimioluminescência. Este RLU possui um ponto de corte, onde foram considerados positivos casos em que o RLU/PC foi maior que a unidade.

Para os dados sociodemográficos e resultados dos testes foram aplicados a ambos os grupos os testes exato de Fisher e do qui-quadrado para significância estatística (intervalo de confiança de 95%).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa sob o número 2309-CEP/HUPE.

## 4 RESULTADOS

No Grupo 1, (sem coitarca) a idade variou de 11 a 20 anos completos (média:15,8± 2,0). Já as pacientes do Grupo 2, (com atividade sexual) a idade variou de 13 a 20 anos (média:16,5± 1,5) . Em ambos os grupos a maioria das pacientes eram estudantes. A menarca no Grupo 1 variou de 8 a 15 (média:11,5 ± 1,5), enquanto que entre as pacientes do Grupo 2 foi de 9 a 15 (média: 11,8±1,3) , tendo o início de vida sexual ocorrido de 12 a 18 anos (média:14,9± 1,5). A idade dos parceiros das pacientes do Grupo 2 variou de 15 a 37 anos (média: 23,4±4,3) e a diferença etária variou de -2 a 20 anos (média=6,4±4,6). A média do número de parceiros variou de 1 a 5, (média=2,1±1,2) (Tabelas 1).

Tabela 1. Dados sociodemográficos.

	Grupo 1 (média ± DP)	Grupo 2 (média ± DP)	<i>p</i>
Idade	15,8± 2,0	16,5 ± 1,5	ns
Menarca	11,5± 1,5	11,8±1,3	ns
Início atividade sexual	-	14,9±1,5	*
Idade dos parceiros	-	23,4±4,3	*
Diferença etária com os parceiros	-	6,4±4,6	*
Número de parceiros	-	2,1±1,1	*

ns: não significativo

\* não se aplica

A positividade geral de DNA de HPV de alto e de baixo risco foi de 72% (72 casos) (Tabela 2). No Grupo 1 houve positividade do teste em 3 casos (6%). Foi critério de exclusão para este grupo qualquer referência ao coito vaginal, no entanto, observou-se que dentre os casos positivos para HPV, duas pacientes relataram contato genital. Um caso foi de DNA-HPV de alto risco e o outro de baixo risco oncogênico. Na única paciente que negou qualquer contato genital foi identificado HPV de baixo risco oncogênico (Tabela 3).

Tabela 2. Pesquisa de DNA-HPV no grupo 1.

DNA-HPV	N	%
Negativo	47	94
Baixo risco	2	4
Alto risco	1	2
Baixo e alto risco	0	0
Total	50	100

Tabela 3. Dados sociodemográficos das pacientes do grupo 1.

Dados sociodemográficos	N	%
Idade (anos)		
11-14	14	28
15-17	24	48
18-20	12	24
Profissão		
Estudante	50	100
Menarca (anos)		
<10	5	10
10-12	32	64
>12	13	26
Contato genital sem penetração		
Sim	2	4
Não	1	2
	47	94

Já no Grupo 2, 33 casos (66%) foram positivos para pelo menos um sítio. Material de vagina foi positivo em 30 casos (60%) e de colo em 27 casos (54%). Houve positividade para DNA-HPV de alto risco em 21 casos, de baixo risco em três casos e concomitante alto e baixo risco em 9 casos. Comparando os resultados dos Grupos 1 e 2 para coleta vaginal temos a tabela 4.

Tabela 4. Pesquisa de DNA-HPV de alto risco e de baixo risco na coleta vaginal nos grupos 1 (sem atividade sexual e com hímen íntegro) e 2 (com atividade sexual).

	Grupo 1 (N=50) N(%)	Grupo 2 (N=50) N(%)
DNA-HPV		
Alto risco	1	21
Baixo risco	2	3
Dois tipos concomitantes	-	9
Positivo (total)*	3 (6%)	33 (66%)
Negativo	47 (94%)	17 (34%)

\*  $p < 0,05$  (teste do quiquadrado), considerando a diferença de casos positivos entre os grupos 1 e 2

Na coleta endocervical no Grupo 2, o DNA-HPV foi negativo em 23 casos, e foi positivo 27 pacientes, das quais 20 casos de alto risco somente, 1 caso apenas de baixo risco, e 6 de alto e baixo risco concomitante. Comparando os dados da positividade dos diferentes sítios podemos visualizar a tabela 5.

Tabela 5. Presença de DNA-HPV segundo a classificação e sítio no grupo 2 (com atividade sexual).

Pesquisa de DNA-HPV	Sítios	
	Vagina N (%)	Endocérvice N (%)
Alto e baixo risco positivos	8 (16)	6 (12)
Alto risco positivo / baixo risco negativo	21 (42)	20 (40)
Baixo risco positivo / alto risco negativo	1 (2)	1 (2)
Alto e baixo risco negativos	20 (40)	23 (46)
Total	50 (100)	50 (100)

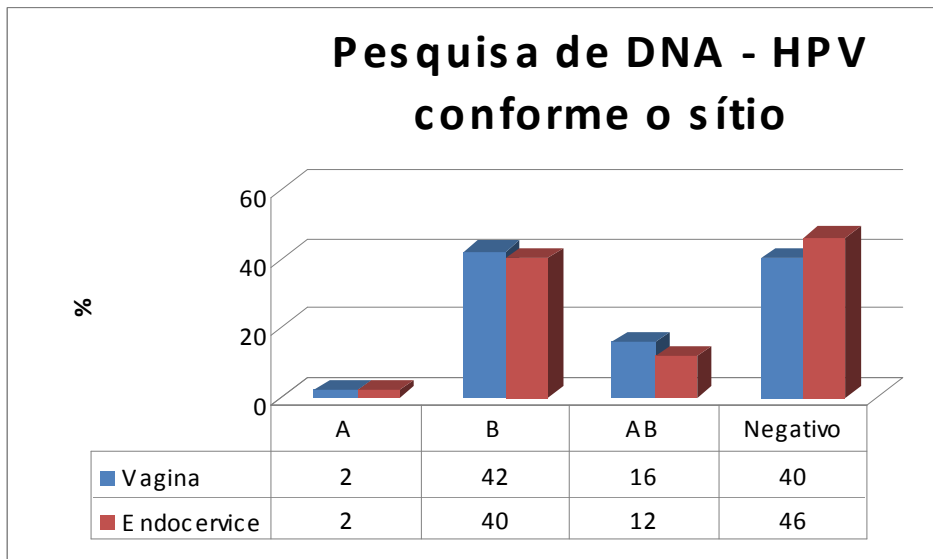


Gráfico 1. Pesquisa DNA-HPV conforme o sítio. ( $p= 0.4752$ )  
 Teste exato de Fisher (IC 95%)

Ao se verificar a positividade dos tipos virais em ambos os sítios, podemos verificar que vagina e colo foram positivos para o mesmo tipo de HPV em 22 casos, dos quais 17 casos foram positivos para HPV de alto risco e em cinco casos ambos foram positivos na vagina para alto e baixo risco concomitantes. Dois casos positivos para alto e baixo risco na vagina foram positivos no colo somente para alto risco e o outro caso somente para baixo risco (Gráfico 2).

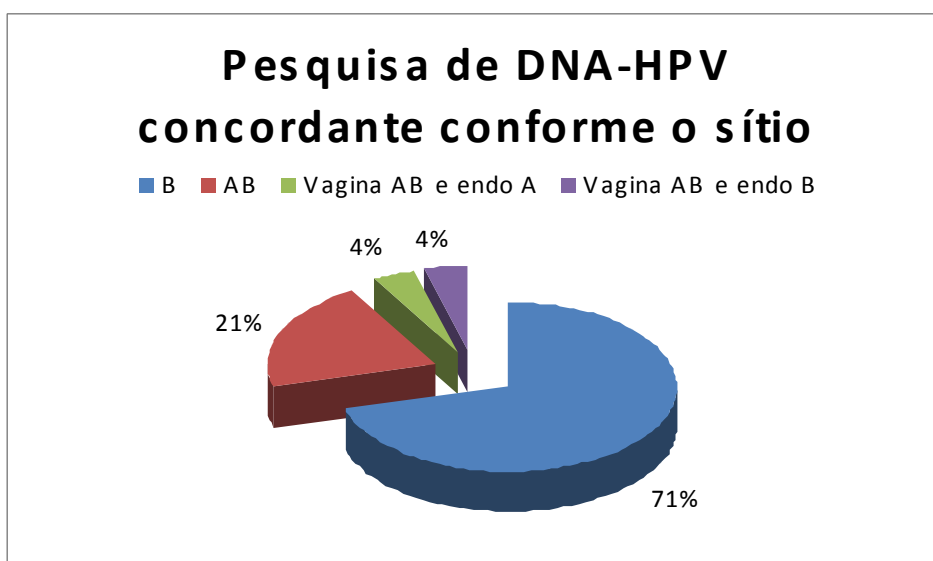


Gráfico 2. Pesquisa de DNA-HPV concordante conforme o sítio.

A positividade apenas em vagina foi quatro para alto risco, um para baixo risco e um para alto e baixo risco concomitantes, enquanto que no colo isoladamente não houve nenhuma positividade (Tabela 6).

Tabela 6. Coinfecção de vagina e colo com o mesmo grupo de vírus.

DNA-HPV	Positivo para mesmo tipo de HPV em vagina e colo simultaneamente	Positivo apenas em vagina	Positivo apenas no colo
	N (%)	N (%)	N (%)
Alto risco	17(77)	4 (67)	0
Baixo risco	0	1 (16,7)	0
Alto e baixo risco	5 (23)	1 (16,7)	0
Total	22	6	0

Ao correlacionar os dados sociodemográficos entre os grupos positivo e negativo no Grupo 2, observamos que a média da idade é maior no grupo negativo, com diferença de pouco mais de um ano. A idade da menarca não variou, observando-se uma média de 11,8 em ambos os grupos. O início de atividade sexual teve uma média de 14,8 e 15,2, para os grupos positivo e negativo respectivamente.

A idade dos parceiros teve uma maior variação no grupo positivo, que foi de 15 a 37 anos, enquanto o grupo negativo teve uma variação de 18 a 25. Apesar disso, a média foi de 22 e 21,5, para os grupos positivo e negativo. Tanto nas adolescentes com amostras positivas quanto nas com amostras negativas os parceiros eram, em média, mais velhos que as parceiras (5,6 e 4,4 anos,

respectivamente). No grupo positivo a diferença etária em relação ao parceiro foi de 2 a 20 anos, enquanto que no grupo negativo foi de 2 a 8 anos.

Em relação ao número de parceiros, foi observada uma variação de um a cinco, com média de dois no caso das pacientes com amostras positivas, e uma variação de um a dois no caso das pacientes com amostras negativas, com uma média inferior quando comparada às positivas, de 1,4 (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação entre variáveis sociodemográficas e a positividade do teste DNA-HPV no grupo 2.

	Positivo Média (desvio padrão)	Negativo Média (desvio padrão)	p
Idade	16,2 (1,40)	17,2 (1,38)	0,02*
Menarca	11,9 (1,44)	11,8 (1,19)	0,94
Início atividade sexual	14,8 (1,52)	15,2 (1,47)	0,35
Idade dos parceiros	22,0 (4,86)	21,5 (2,46)	0,66
Diferença etária com os parceiros	5,7 (1,44)	4,4 (2,13)	0,05*
Número de parceiros	2,0 (1,29)	1,4 (0,5)	0,02*

\*p significativo.

## 5 DISCUSSÃO

A transmissão não sexual do HPV é motivo de controvérsia e não se sabe com certeza qual a sua frequência. Avaliações específicas em populações pequenas deverão abrir possibilidades para estudos populacionais, em que haja uma maior noção sobre a transmissibilidade do HPV. Esta discussão se faz necessária para a definição da postura clínica adequada, assim como estudo epidemiológico de uma população pouco explorada.

A idade da menarca encontrada no nosso trabalho foi de 11,5 e 11,8 nos grupos de pacientes sem coitarca e com atividade sexual (grupos 1 e 2), respectivamente. Estes dados corroboram o estudo realizado por Taquette et al. (2004) em adolescentes de 12 a 19 anos no Rio de Janeiro, que indicou menarca de 11,8. A idade de primeira relação sexual foi em média de 14,9, bastante próxima da encontrada pelo mesmo estudo citado acima, cuja média foi de 14,7. O estudo de Roteli-Martins et al. (2007) foi realizado em mulheres de três regiões diferentes do Brasil, e mostrou uma média de sexarca de 18,5 (DP=4,0), mas com a ressalva de que as mulheres mais jovens relataram sexarca mais precocemente que as mulheres mais velhas, demonstrando que os adolescentes estão começando a vida sexual cada vez mais cedo quando comparado a outras gerações.

No presente estudo foi possível encontrar 72% das pacientes com amostras positivas para DNA-HPV, sendo que em 6% (3 casos) das meninas sem história de coito vaginal o teste foi positivo, no entanto uma delas não havia história sequer de contato genital. A infecção por HPV apenas pelo contato genital sem penetração já foi sugerida anteriormente pelo trabalho de Winer et al. (2003), sendo uma possível via de transmissão para virgens. Porém, um de nossos casos não teria tal explicação para a positividade do teste do HPV, uma vez que a paciente negou qualquer contato genital. Outros trabalhos, utilizando métodos diferentes, observaram possível infecção por HPV em pacientes sem atividade sexual. Os números são variáveis entre 4,9%, utilizando anticorpos IgG anti-L1 (SHIN ET AL., 2003), e 14,8%, utilizando PCR (PAO ET AL., 1993). Contrariamente, Shimada et al. (2007) em um estudo realizado com 251 pacientes de instituição psiquiátrica, não encontrou positividade para DNA-HPV por método de captura híbrida em virgens. Salienta-se ainda o fato de a coleta ter sido realizada no vestíbulo vulvar, tanto neste



quanto em outros estudos, podendo ser subestimada a prevalência de DNA-HPV quando comparada à vagina e colo.

Dos três casos positivos para DNA-HPV em virgens de nosso estudo, dois eram de baixo risco (66%). Achado também referido por Kjaer et al. (2001) através de ELISA em 100 virgens, que identificou um caso de DNA-HPV fracamente positivo para o tipo 6 (baixo risco oncogênico). Rintala et al. (2005) estudou a dinâmica da transmissão do HPV entre membros de famílias durante 24 meses, através de PCR que o perfil mais comum foi o HPV de alto risco em todos os membros da família (29%), seguido pelo par mãe-filho (26%). A positividade no par pai-filho foi menos freqüente (11%) e em seis famílias (8%) somente o filho era positivo. A prevalência de HPV de alto risco nos pais variou de 13 a 25% nos raspados genitais e de 8 a 34% nos raspados orais. Nos filhos, o DNA de HPV foi detectado em 15% das amostras genitais e 10% das orais ao nascimento, alcançando picos de 18 a 21%, respectivamente, aos 6 meses e diminuindo para 10% aos 24 meses. Isto abre a questão da possibilidade de eventuais infecções neonatais persistirem latentes até a adolescência, o que ainda é motivo de controvérsias.

As pacientes que relataram coito vaginal (grupo 2) tiveram positividade de captura híbrida para HPV em 66% das vezes, sendo 58% para HPV de alto risco. No Brasil, outros pesquisadores observaram resultados variando desde 27% utilizando PCR, em Alagoas (BARROS E ROCHA, 2003) a 50,1% por captura híbrida, no Rio de Janeiro (CARVALHO ET AL., 2005). Vale salientar que diferenças metodológicas e de número de sítios pesquisados justificam a variação destes percentuais de positividade. Embora um estudo baseando-se na sorologia (RAMA ET AL., 2006) tenha observado que apenas 27,7% dos seus casos foram positivos para HPV, os tipos pesquisados foram 16 e 18, diferente de nossa pesquisa que utilizou sondas de captura híbrida que identificam 13 tipos de HPV de alto risco e 5 de baixo risco.

Concordância dos tipos de HPV em ambos os sítios foi observado em 71% para alto risco e 21% para baixo e alto risco. Houve maior positividade na vagina (60%) que na endocérvice (54%), o que não foi significativo ( $p= 0.4752$ ), que vai de encontro à história natural, de que HPV multiplica-se mais na zona de transformação do colo.

Os fatores associados à infecção por HPV nas pacientes com atividade sexual neste estudo foram idade, número de parceiros e diferença etária do parceiro.

A idade é bem relatada na população geral, assim como já é referenciado em grupo específico de adolescentes como um fator de risco para aquisição da infecção por HPV (MOSCICKI, 2005; ROUSSEAU ET AL., 2000). Vacarella et al. (2006) e Rousseau et al. (2000) concluíram em seus estudos que o número de parceiros está associado com a positividade de HPV, e Moscicki et al. (2001) estimam que a cada novo parceiro por mês o risco de infecção aumenta em 10 vezes. Apesar da polêmica, estudos como o de Kjaer et al. (2001) demonstraram que o risco de aquisição do HPV é cinco vezes maior para adolescentes cujo primeiro parceiro possui mais de 10 anos de diferença.

Destaca-se a sexarca como grande marco na transmissão não só da infecção por HPV, como de outros agentes essencialmente transmitidos pela via sexual. Este fato já observado há séculos na história da Medicina deve-se a características próprias, em especial da adolescência onde soluções de continuidade em grande número na vulva, vagina e colo uterino (neste ocasionado pela metaplasia) facilitam a penetração de vírus e bactérias, tendo o HPV facilidade de penetrar na camada basal do epitélio, iniciando seu ciclo infeccioso. Portanto o coito, sobretudo a coitarca, é grande fator facilitador na transmissão de HPV, porém não é obrigatório, Vale ressaltar que não há significado clínico individual o fato de as mesmas terem tido resultados positivos, já que a literatura mundial confirma a grande prevalência de infecção por HPV que regridem espontaneamente, em sua grande maioria (MOSCICKI, 2003).

Entre adolescentes com vida sexual ativa, há maior risco de desenvolver a doença por HPV (verrugas ou neoplasias intraepiteliais), por apresentarem os cofatores infecciosos, químicos e físicos inerentes a esta faixa etária, sobretudo com coito desprotegido. Isto porque as adolescentes apresentam maior susceptibilidade às agressões cervicais uterinas, pela ectopia própria da fase da vida, muitas vezes intensificada pela ação dos contraceptivos hormonais, com processo metaplásico jovem e dinâmico (TAQUETTE ET AL., 2004; MOSCICKI, 2005).

## 6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a infecção pelo HPV pode ocorrer em meninas sem coitarca, tanto nos casos em que houve contato genital, quanto em casos que não houve nenhum contato. No caso do contato genital, podemos considerar o contato sendo uma via de transmissão para o HPV em virgens. Enquanto que quando se exclui contato sexual, observamos que há a possibilidade de transmissão sem ser pela via sexual. Sabemos que o número de casos estudados ainda é pequeno, havendo necessidade de trabalhos de estudo populacional para conclusões mais robustas, no entanto nossos dados se somam a aqueles que tem demonstrado a possibilidade da transmissão não sexual da infecção pelo HPV entre meninas.

A positividade nas meninas com vida sexual ativa é alta, sendo a idade, diferença etária com o parceiro e número de parceiros fatores associados a aquisição da infecção por HPV.

## REFERÊNCIAS

1. Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J Virol*. 2000; 74(24): 11636-41.
2. Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(6): 2509-14.
3. Barros LDF, Rocha JES. Infecção genital pelo papiloma vírus humano (HPV) em adolescentes: diagnóstico biomolecular. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2006; 28(12): 742.
4. Bellanger S, Tan CL, Nei W, He PP, Thierry F. The human papillomavirus type 18 E2 protein is a cell cycle-dependent target of the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *J Virol*. 2010; 84(1): 437-44.
5. Bernard C, Mougín C, Bettinger D, Didier JM, Lab M. Detection of human papillomavirus by in situ polymerase chain reaction in paraffin-embedded cervical biopsies. *Mol Cell Probes*. 1994; 8(5): 337-43.
6. Bernard, HU. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol*. 2005; 32(1): 1-6.
7. Beznos G, Coates V, Focchi J, Omar HA. Biomolecular study of the correlation between papillomatosis of the vulvar vestibule in adolescents and human papillomavirus. *ScientificWorldJournal*. 2006 ;6(1): 628-36.
8. Bhattacharya P, Sengupta S. Predisposition to HPV16/18-related cervical cancer because of proline homozygosity at codon 72 of p53 among Indian women is influenced by HLA-B\*07 and homozygosity of HLA-DQB1\*03. *Tissue Antigens*. 2007; 70(4): 283-93.

9. Brown DR, Bryan JT, Wools K, Rodriguez M, Tyring S. Detection of human papillomavirus L1 protein in condylomata acuminata from adults with defects in cell-mediated immunity. *J Med Virol.* 1993; 41(1): 79-84.
10. Buitrago-Pérez A, Garaulet G, Vázquez-Carballo A, Paramio JM, García-Escudero R. Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Curr Genomics.* 2009; 10(1): 26-34.
11. Burd, EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1): 1-17.
12. Campisi G, Giovannelli L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol.* 2009; 30; 1(1):8.
13. Carvalho MOO, Carestiato FN, Perdigão PH, Xavier MPPT, Silva KC, Botelho MO et al. Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(5): 398-404.
14. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89(2): 191-9.
15. Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H et al. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol.* 2002; 68(3): 417-23.
16. Centers for Disease Control and Prevention [homepage]. USA; [atualizado em 2010; acessado em 10 fev. 2010]. [3 telas]. Disponível em: [www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/).
17. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2003; 88(1): 63-73.

18. De Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherübl H. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer*. 2004; 109(2): 253-8.
19. Dias EP, Barcelos JMP, Fonseca MEF, Basso NGS. Congenital papillomas and papillomatoses associated with the Human Papilloma Virus (HPV): report on 5 cases. *Sao Paulo Med. J.* 1995; 113(4): 957-63.
20. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006; 110(5): 525-41.
21. Eleutério Jr, J. Noções básicas de citologia ginecológica. 1ª edição. São Paulo: Santos; 2003.
22. Eleutério Jr J, Giraldo PC, Cavalcante DI, Gonçalves AK, Eleutério RM. Association between high risk HPV viral load, p16ink4a expression and intra-epithelial cervical lesions] *Rev Assoc Med Bras*. 2007; 53(6): 530-4.
23. Fedrizzi EN, Carvalho NS, Villa LL, Souza IV, Sebastião APM. Pesquisa da prevalência do papilomavírus humano em amostras de tecido endometrial normal e com carcinoma pela técnica de PCR. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2004; 26(4): 277-87.
24. Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. *Obstet Gynecol*. 1989; 74(6): 950-4.
25. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol*. 2002; 3(1): 11-6.
26. Ferizi M, Gercari A, Pajaziti L, Blyta Y, Kocinaj A, Dobruna S. Condyloma acuminata in child end laser therapy: a case report. *Cases Journal*. 2009; 2(1): 123.

27. Forslund O, DeAngelis PM, Beigi M, Schjolberg AR, Clausen OP. Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(7): 423-9.
28. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(1): 46-54.
29. Frega A, Cenci M, Stentella P, Cipriano L, De Ioris A, Alderiso M et al. Human papillomavirus in virgins and behaviour at risk. *Cancer Lett.* 2003; 194(1): 21-4.
30. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 2009; 34(1): 113-23.
31. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010; 40(1): 1-13.
32. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB et al. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(6): 888-94.
33. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2001; 84(9): 1219-26.
34. Ho GY, Palan PR, Basu J, Romney SL, Kadish AS, Mikhail M et al. Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Int J Cancer.* 1998; 78(5): 594-9.
35. Hu L, Plafker K, Vorozhko V, Zuna RE, Hanigan MH, Gorbsky GJ et al. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. *Virology.* 2009; 384(1): 125-34.

36. IARC .[IARC.] Internacional Agency for Research on cancer monograph on the evaluation of carcinogenic risks to human. Human papillomaviruses, 1995; 64.
37. Instituto Nacional do Câncer [homepage]. Rio de Janeiro, RJ: c1996 [Acessado em 20 fev. 2010]. [3 telas]. Disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).
38. Jacyntho CMA. HPV O vírus do câncer pelo sexo? Nossas dúvidas! 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora do Autor; 2001.
39. Jayasinghe Y, Garland SM. Genital warts in children: what do they mean? Arch Dis Child. 2006; 91(8): 696-700.
40. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001; 10(2): 101-6.
41. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. Br J Cancer. 2000; 82(7): 1332-8.
42. Linhares, AC, Villa, LL. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). Jornal de Pediatria. 2006; 82(3): 25-33.
43. Magnusson PK, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. Int J Cancer. 2000; 88(5): 698-701.
44. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. Virus Res. 2009; 143(2): 195-208.



45. Medeiros LR, Ethur AB, Hilgert JB, Zanini RR, Berwanger O, Bozzetti MC et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saúde Pública*. 2005; 21(4): 1006-15.
46. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*. 2002; 21(18): 4754-62.
47. Moscicki AB. Genital HPV infections in children and adolescents. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1996; 23(3): 675-97.
48. Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health*. 2005; 37(6 Suppl): S3-9.
49. Moscicki AB. HPV infections in adolescents. *Dis Markers*. 2007; 23(4): 229-34.
50. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001; 285(23): 2995-3002.
51. Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(6): 2040-1.
52. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S3/1-10.
53. Nakahara T, Nishimura A, Tanaka M, Ueno T, Ishimoto A, Sakai H. Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4. *J Virol*. 2002; 76(21): 10914-20.
54. Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev. Saúde Pública* 2002; 36(1): 95-100.

55. Obalek S, Misiewicz J, Jablonska S, Favre M, Orth G. Childhood condyloma acuminatum: association with genital and cutaneous human papillomaviruses. *Pediatr Dermatol*. 1993; 10(2): 1-6.
56. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhn YS. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin/proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010; 31(3): 402-10.
57. Organização Mundial de Saúde [homepage]. [Acessado em 17 fev. 2010]. [5 telas]. Disponível em [www.who.int/en](http://www.who.int/en).
58. Pao CC, Tsai PL, Chang YL, Hsieh TT, Jin JY. Possible non-sexual transmission of genital human papillomavirus infections in young women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993; 12(3): 221-2.
59. Palefsky JM, Winkler B, Rabanus JP, Clark C, Chan S, Nizet V et al. Characterization of in vivo expression of the human papillomavirus type 16 E4 protein in cervical biopsy tissues. *J Clin Invest*. 1991; 87(6): 2132-41.
60. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55(2): 74-108.
61. Perez LA. Genital HPV: links to cervical cancer, treatment, and prevention. *Clin Lab Sci*. 2001; 14(3): 183-6.
62. Plummer M, Herrero R, Franceschi S, Meijer CJ, Snijders P, Bosch FX et al. IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control*. 2003; 14(9): 805-14.
63. Qiagen Molecular Diagnosis [homepage]. São Paulo, SP: c2003 [Acessado em 15 fev. 2010]. [4 telas]. Disponível em: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

64. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Oliveira EZ, Aldrighi JM, Mariani NC. Detecção sorológica de anti-HPV 16 e 18 e sua associação com os achados do papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2006; 52(1): 43-7.
65. Rintala MAM, Grénman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO et al. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infants: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 376-81.
66. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol.* 1997; 71(5): 3554-62.
67. Roden RBS, Kirnbauer R, Jenson AB, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of Papillomaviruses with the cell surface. *J Virol.* 1994; 68(11): 7260-6.
68. Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis.* 1997; 176(4): 1076-9.
69. Ronco G. Use of molecular tests of human papilloma virus (HPV) as screening test for cervix cancer: a review. *Epidemiol Prev.* 1999; 23(4): 372-7.
70. Roteli-Martins CM, Longatto-Filho A, Hammes LS, Derchain SFM, Naud P, Matos JC et al. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subsequente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2007; 29(11): 580-7.
71. Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM et al. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9(5): 469-76.

72. Sarkola ME, Grenman SE, Rintala MA, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87(11): 1181-8
73. Shimada T, Miyashita M, Miura S, Nakayama D, Miura K, Fukuda M et al. Genital human papilloma virus infection in mentally-institutionalized virgins. *Gynecol Oncol.* 2007; 106(3): 488-9.
74. Shin HR, Lee DH, Herrero R, Smith JS, Vacarella S, Hong SH et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Busan, South Korea. *Int J Cancer.* 2003; 103(3): 413-21.
75. Sinal SH, Woods CR. Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005; 16(4): 306-16.
76. Sinclair KA, Woods CR, Kirse DJ, Sinal SH. Anogenital and respiratory tract human papillomavirus infections among Children: Age, Gender, and Potential Transmission Through Sexual Abuse. *Pediatrics.* 2005; 116(4): 815-25.
77. Taquette SR, Vilhena MM, Paula MC. Doenças sexualmente transmissíveis na adolescência: estudo de fatores de risco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37(3): 210-214.
78. Tseng CJ, Liang CC, Soong YK, Pao CC. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(1): 92-6.
79. Vaccarella S, Franceschi S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Clifford GM et al. Sexual behavior, condom use, and human papillomavirus: pooled analysis of the IARC human papillomavirus prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(2): 326-33.

80. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol.* 2009; 19(2): 97-113.
81. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003; 157(3): 218-26.
82. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(9): 690-8.