

REVISTA JOVENS PESQUISADORES



Doi: 10.17058/rjp.v8i1.12090

Recebido em: 15/05/2018

Aceito em: 31/07/2018

PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA A GENOTIPAGEM DE HPV 6-11, HPV 16 E HPV 18 UTILIZANDO CONTROLE INTERNO

BERNARDY, J. P.¹; BIERHALS, N. D.²; POSSUELO, L. G.³; RENNER, J. D. P.³**PALAVRAS CHAVE:** HPV. Câncer de colo de útero. PCR em tempo real.

RESUMO

O *Papilomavírus humano* (HPV) é um dos agentes etiológicos mais comuns das infecções sexualmente transmissíveis. Os tipos de alto risco oncogênico têm relação com o desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais e do câncer invasor do colo uterino, da vulva, da vagina e da região anal. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi padronizar a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-PCR) para diagnóstico de HPV e genotipar os HPV 6-11, 16 e 18 em amostras cérvico-vaginais de mulheres atendidas pelo Serviço Integrado de Saúde (SIS) da Universidade de Santa Cruz do Sul. Foi realizado um estudo transversal, em que a coleta de amostras foi efetivada no período de fevereiro a maio de 2015 com mulheres que realizaram a coleta de Papanicolaou. As amostras foram analisadas pelo método de RT-PCR utilizando fluorescência por SYBR Green. Para presença do HPV foram utilizados *primers* consenso e para a detecção dos genótipos de HPV-06/11, 16 e 18 foram utilizados *primers* específicos. A β -globina foi utilizada como controle interno. Foram padronizadas as técnicas de RT-PCR para diagnóstico e genotipagem com controle interno e testadas em 99 amostras cérvico-vaginais. As amostras testadas foram negativas para HPV utilizando a técnica padronizada. Concluiu-se que foi possível padronizar a técnica de RT-PCR para diagnóstico HPV e genotipagem de HPV-16 com controle interno.

STANDARDIZATION OF REAL-TIME PCR FOR THE HPV GENETIPAGE 6-11, HPV 16 AND HPV 18 USING INTERNAL CONTROL

KEYWORDS: HPV. Cervical cancer. Real-time PCR.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common etiological agents of sexually transmitted infections. The types of high oncogenic risk are related to the development of intraepithelial neoplasias and invasive cancer of the uterine cervix, vulva, vagina and anal region. In this context, the objective of this study was to standardize the Real-Time Chain Polymerase Reaction (RT-PCR) technique for HPV diagnosis and to genotype HPV 6-11, 16 and 18 in cervicovaginal samples of women treated by the Integrated Health Service (IHS) of the University of the Santa Cruz do Sul. A cross-sectional study was carried out, in which the collection of samples was carried out between February and May 2015 with women who underwent Papanicolaou collection. Samples were analyzed by the RT-PCR method using SYBR Green fluorescence. Consensus primers were used to detect the presence of HPV, and specific primers were used to detect HPV-06/11, 16 and 18 genotypes. B-globin was used as internal control. RT-PCR techniques for diagnosis and genotyping with internal control were standardized and tested on 99 cervicovaginal samples. The samples tested were HPV negative using the standardized technique. It was concluded that it was possible to standardize the RT-PCR technique for HPV diagnosis and HPV-16 genotyping with internal control.

¹ Graduado em Farmácia pela Universidade de Santa Cruz do Sul.² Acadêmica do curso de Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul.³ Docentes do Departamento de Biologia e Farmácia na Universidade de Santa Cruz do Sul.

1 INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um dos agentes etiológicos mais comum das infecções sexualmente transmissíveis (IST) e em mulheres é o principal fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e câncer cervical (BRASIL, 2008). O câncer de colo do útero se desenvolve após um longo período de tempo; aproximadamente 20 anos a partir da infecção por HPV inicial para o aparecimento do câncer invasivo. No Brasil, o câncer de colo do útero é o segundo mais comum entre a população feminina e a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres (LORENZI et al., 2013; BRASIL, 2016). A relação do HPV com o câncer do colo de útero está, sobretudo, relacionada com a carga e tipo viral (alto ou baixo risco oncogênico), de sua persistência e também a integração com a célula hospedeira.

O HPV é um vírus DNA da família *papillomaviridae*, com mais de 150 tipos reconhecidos atualmente, dos quais 40 podem infectar o trato genital (BRASIL, 2018). Os HPV de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66) são aqueles associados ao câncer cervical, sendo o 16 e 18 responsáveis por 70% dos casos (ERMAL et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2018). Já os tipos de HPV 6, 11, 42, 43 e 44 estão associados às infecções benignas do trato genital como o condiloma acuminado ou plano e lesões intra-epiteliais de baixo grau. Estão presentes em cerca de 90% na maioria das infecções clinicamente aparentes (verrugas genitais visíveis) e podem aparecer na vulva, no colo uterino, na vagina e no ânus (ABREU et al., 2012; BRASIL, 2006).

Considerado o padrão-ouro para o diagnóstico do HPV, o exame citopatológico do colo de útero (exame de Papanicolau) é o principal método de rastreamento de câncer cervical, no Brasil (BRASIL, 2016). No entanto, devido as suas limitações, existem outros métodos mais precisos e sensíveis para detecção do HPV como os testes baseados na identificação do DNA viral. Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), baseiam-se na amplificação dos ácidos nucléicos do HPV, que permitem o diagnóstico precoce da doença, bem como diagnosticá-la na sua forma latente onde não apresenta lesões aparentes (LUU et al., 2013), assim como pode identificar os diferentes tipos de HPV (de baixo e de alto risco oncogênico). Por apresentarem grande sensibilidade, têm sido foco de interesse de muitos estudiosos e dado enorme contribuição aos estudos epidemiológicos e clínicos (BRINGHENTI et al., 2010).

Métodos de PCR permitem a detecção de uma grande variedade de genótipos de HPV que infectam o trato anogenital. No entanto, a PCR com iniciadores consenso de largo espectro podem sub-representar a verdadeira prevalência de HPV (SCHMITT et al., 2010). O conjunto de iniciadores (*primers*) consenso MY09/11 é amplamente utilizado, tendo como alvo uma sequência de 450pb conservada no gene L1 de HPV, capaz de amplificar um amplo espectro de tipos de HPV genital (CAMARGO et al. 2011; QU et al., 1997).

Para a detecção do HPV, geralmente o método molecular mais escolhido é pela PCR que utiliza *primers* consenso, sendo o par de iniciadores mais comuns o MY09-11. Os iniciadores MY09/11 são utilizados como alvo de uma sequência de 450 pb conservada no gene L1 de HPV, possibilitando a amplificação de um amplo espectro de tipos de HPV genital. No entanto, *primers* específicos são utilizados na genotipagem do vírus, e consistem em identificar alterações nos genes E6 e E7 (DEPUYDT et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi padronizar o diagnóstico de HPV por PCR em Tempo Real (RT-PCR) utilizando um controle interno, além de realizar a genotipagem em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam a coleta de Papanicolaou pelo Serviço Integrado de Saúde (SIS) da Universidade de Santa Cruz do Sul.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, em que a coleta de amostras foi efetivada no período de fevereiro a maio de 2015 com mulheres que realizaram a coleta de Papanicolaou no Serviço Integrado de Saúde (SIS) da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

Foi realizada a apresentação do projeto para as mulheres, e, aquelas que aceitaram participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam ao questionário clínico-epidemiológico com informações como: idade, estado civil, escolaridade, raça, parceiros sexuais durante a vida, uso de preservativo, uso de anticoncepcional, idade da primeira relação sexual, histórico de infecções sexualmente transmissíveis (IST), histórico de ferida no colo do útero. Foram excluídas as mulheres menores de 18 anos e gestantes.

As amostras clínicas foram coletadas por ginecologistas ou enfermeiras por raspagem da mucosa cérvico-vaginal, com auxílio da espátula de Ayre ou escovas do tipo *cytobrush*. O material de secreção da mucosa vaginal foi acondicionado a uma temperatura de -20°C, em um tubo apropriado contendo aproximadamente 2 mL de solução TE 1X (Tris-EDTA), até o momento da extração do DNA.

Para a extração de DNA foi utilizado o método de digestão enzimática com proteinase K, adaptado de Mahony et al. (1993). O material coletado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 500 µl de TE 1x, e para a extração do DNA das células foi adicionado 5 µl de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µl de *Twen* 80 (10%), após incubados por 1 hora a 65°C, em seguida a proteinase K foi inativada com incubação por 10 minutos a 100°C, após foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A solução obtida que contém o DNA extraído foi quantificada no Nano Drop (*ThermoScientific* Nano Drop 2000c) e estocada a -20°C, até ser utilizada na reação de amplificação.

A RT-PCR consistiu na padronização da temperatura de *melting* (T_m), utilizando fluorescência por *SYBR Green Select Master mix* (Life Technologies®), na qual foram utilizados os *primers* descritos

na Tabela 1. Como controle positivo para HPV foram utilizadas amostras positivas por PCR convencional pertencentes a um banco de amostras. Todas as amostras foram testadas em duplicata por esta metodologia.

Tabela 1. Iniciadores, fragmentos e autores da PCR para HPV.

| Primers | Sequências | Fragmento (pb) | Referência |
|--------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| MY 09 | 5'CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' | 450 | Manos <i>et al.</i> |
| MY 11 | 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3' | | 1989 |
| HPV 16 F | 5'CAGATCATCAAGAACACGTAGAGA 3' | 167 | Sahiner <i>et al.</i> |
| HPV 16 R | 5'CCAGCTGGACCATCTATTTTCAT 3' | | 2014 |
| HPV 18 F | 5'CAGTGCCATTCGTGCTGCAA 3' | 142 | Sahiner <i>et al.</i> |
| HPV 18 R | 5'GGAATTTTCATTTTGRGGCTCTAAA 3' | | 2014 |
| β -globina F | 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' | 100 | Sahiner <i>et al.</i> |
| β -globina R | 5' CAACTTCATCCACGTTCAACC 3' | | 2014 |

A reação foi padronizada conforme instruções do fabricante e continha: 10 μ l de SYBR Select Master Mix, 1 μ l dos primers forward e reverse a 10 pmol e 2 μ l de DNA a 30 ng/ μ l. Utilizou-se o equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) com as seguintes condições de temperatura e ciclagem: desnaturação 95°C por 2', 40 ciclos de amplificação com desnaturação de 95°C por 15", anelamento e extensão de 60°C por 1'. A curva de *melting* do StepOnePlus consiste em um ciclo de 95°C por 15", seguido de 60°C por 1', e 95°C por 15" com transição de uma média de 0.3°C/s.

Para analisar a sensibilidade da técnica molecular foi realizada uma diluição seriada de 10 vezes a partir de uma concentração de DNA de uma amostra positiva para HPV.

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram analisados por estatística descritiva das variáveis incluindo médias, frequências e desvio padrão. As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de χ^2 ou teste exato de Fischer. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo. Foi utilizado para as análises estatísticas o programa SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill).

Este estudo foi realizado conforme a resolução 466/12 CNS, sendo respeitados os preceitos éticos dos indivíduos participantes. O mesmo faz parte de um projeto maior denominado: "Desenvolvimento de um teste comercial para diagnóstico e genotipagem do vírus HPV por reação em cadeia da polimerase em amostras cérvico-vaginais e da orofaringe em Santa Cruz do Sul", aprovado pelo CEP/UNISC, sob Parecer de n°: 665.482 e CAAE: 25780714.7.0000.5343.

3 RESULTADOS

Participaram do estudo 99 mulheres, com média de idade de 43,56 \pm 13,27 anos, que variou entre 18-65 anos. A maioria das mulheres (64,6%) eram casadas e possuíam ensino médio

completo (52,5%). Em relação à história de tabagismo, 16,2% das mulheres eram tabagistas. As variáveis sociodemográficas e clínicas estão apresentadas na Tabela 2.

Na avaliação de IST, 7,1% das mulheres já tiveram alguma IST, destas 5 mulheres já foram diagnosticadas com HPV. Já em histórico de ferida no colo do útero, 20,2% já tiveram ferida. Quanto ao número de filhos, a maioria das mulheres tinham 2 filhos (42,4%) (Tabela 2).

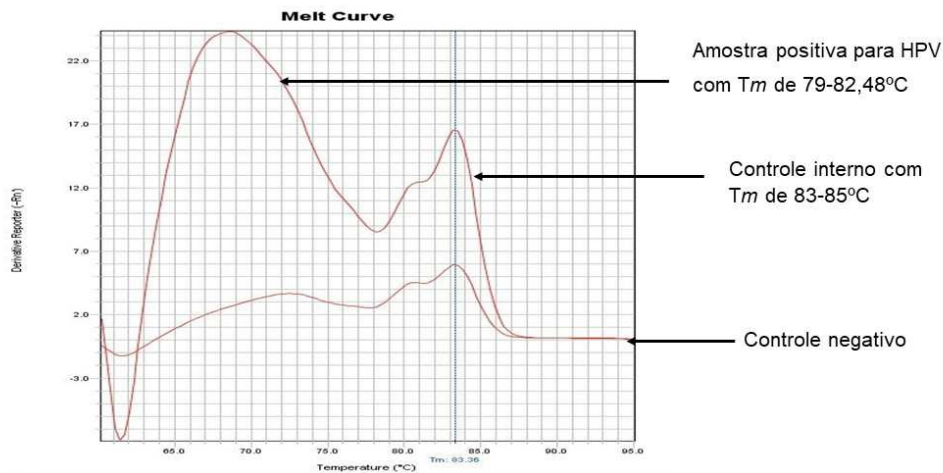
Para avaliar o comportamento sexual, foi analisado através do número de parceiros e observou-se que a maioria das mulheres tiveram 1-2 parceiros (64,6%) durante a vida. Quanto ao uso de preservativos 56,6% relataram não fazer uso de preservativos. A frequência do uso de anticoncepcionais orais foi de 42,4% (Tabela 2). Todas as pacientes apresentaram resultado negativo no exame de Papanicolau.

Tabela 2. Informações sociodemográficas e clínicas de mulheres atendidas no SIS-UNISC.

| Variáveis | Frequência N(%) |
|--------------------------------|-----------------|
| Idade | |
| 18-29 | 15 (15,2) |
| 30-39 | 26 (26,3) |
| 40-49 | 21 (21,2) |
| 50-59 | 24 (24,2) |
| mais de 60 | 13 (13,1) |
| Estado civil | |
| Solteira | 26 (26,3) |
| Casada | 64 (64,6) |
| Divorciada | 5 (5,1) |
| Viúva | 4 (4,0) |
| Escolaridade | |
| EM completo | 52 (52,5) |
| EM incompleto | 14 (14,1) |
| EF completo | 8 (8,1) |
| EF incompleto | 25 (25,3) |
| Ferida de colo de útero | |
| Sim | 20 (20,2) |
| Já teve HPV | |
| Sim | 5 (5,1) |
| Número de parceiros | |
| 1-2 | 64 (64,6) |
| 3-4 | 21 (21,2) |
| mais de 5 | 14 (14,1) |
| Anticoncepcional | |
| Sim | 42 (42,4) |
| Uso de preservativo | |
| Sim | 29 (29,3) |
| As vezes | 14 (14,1) |
| Fumante | |
| Sim | 16 (16,2) |
| IST | |
| Sim | 7 (7,1) |
| Filhos | |
| Não tem | 19 (19,2) |
| 1 filho | 21 (21,2) |
| 2 filhos | 42 (42,4) |
| mais de 3 | 17 (17,2) |

A reação de RT-PCR realizada no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR*, para detecção do vírus HPV, obteve uma temperatura de *melting* (T_m) com variação de 79,2 – 82,48 °C. O controle interno obteve o pico com T_m entre 83-84 °C (Figura 1). Ocorreu a presença de dímeros entre os *primers* consenso (T_m 60-75 °C), que pode-se diferenciar através das T_m de HPV positivo e controle negativo para HPV.

Figura 1. RT-PCR para HPV utilizando os primers MY09-11 e controle interno (β -globina) emitido pelo software do equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems).



Legenda: T_m : temperatura de *melting*

O teste de sensibilidade, realizado pela técnica de RT-PCR, demonstrou que foi possível obter diagnóstico positivo para HPV em concentração até 1 ng/ μ l de DNA (Figura 2).

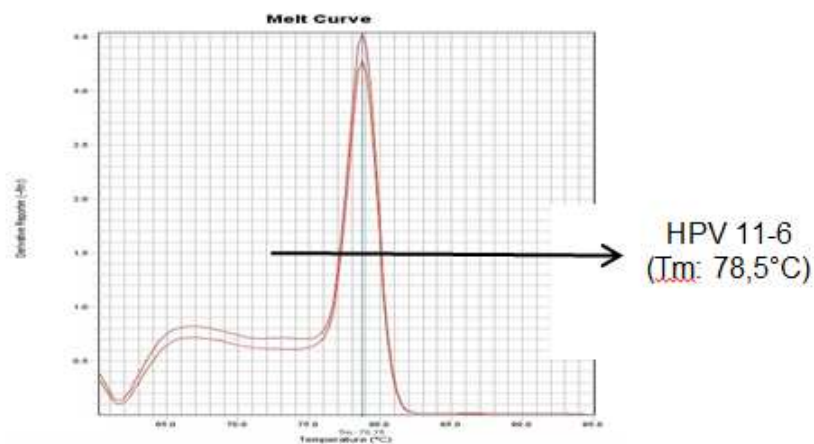
Figura 2. Gel de agarose 1,5% com os resultados do teste de sensibilidade pela técnica de RT-PCR.



Legenda: MP- marcador de peso molecular de 100pb; CN- controle negativo; CP- controle positivo; 5-1 diluições seriadas do DNA com concentrações das amostras de 5 ng/ μ l a 1 ng/ μ l.

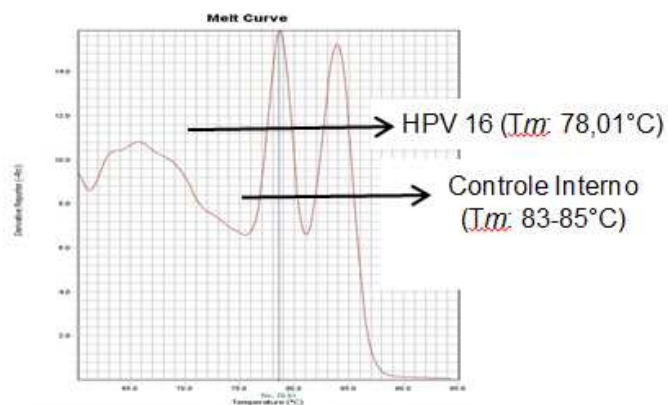
A padronização da genotipagem de HPV-6/11, HPV-16 e HPV-18 encontram-se nas Figuras 3, 4 e 5. A padronização da genotipagem do HPV-6/11 obteve uma temperatura de *melting* (T_m) de 78,5°C. O controle interno obteve a T_m na mesma faixa do teste positivo para HPV-6/11(Figura 3).

Figura 3. Curva de *melting* de HPV 11-6 emitido pelo software do equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems)*.



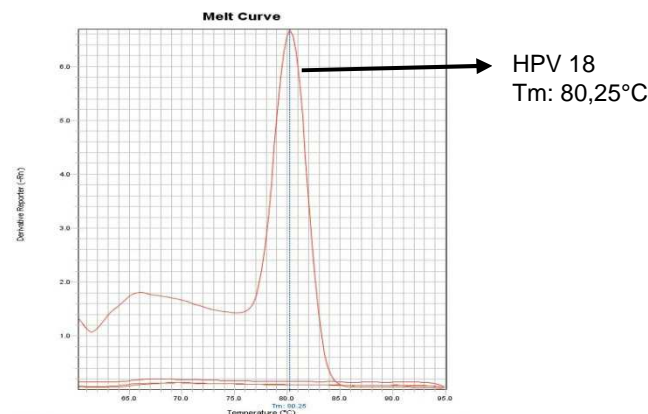
A padronização da genotipagem do HPV-16 obteve uma temperatura de *melting* (T_m) de 78,01°C. O controle interno obteve uma média de T_m de 83-85°C (Figura 4).

Figura 4. RT-PCR para HPV-16 e controle interno (β -globina) emitido pelo software do equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems)*



A padronização da genotipagem do HPV-18 obteve uma temperatura de *melting* (T_m) de 80,25°C. Não foi possível padronizar com o controle interno, já que obteve a T_m na mesma faixa de temperatura (Figura 5).

Figura 5 - Curva de *melting* de HPV 18 emitido pelo software do equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems)*



4 DISCUSSÃO

O HPV é atualmente o vírus mais comum quando se trata IST no mundo, o qual está relacionado principalmente ao desenvolvimento do câncer cervical. A relação entre os dois pode ser justificada, uma vez que o número de pessoas com o vírus e a incidência de mulheres com esse tipo de câncer aumentou de 10 para 40% nos últimos anos (MULLER, 2016; SONG, 2017). Estimativas indicam que cerca de 75-80% das pessoas podem ser infectadas pelo vírus em algum momento da sua vida (GADELHA et al., 2017).

Diversos fatores parecem estar associados à presença de infecção genital pelo HPV, especialmente os referentes ao comportamento sexual (idade da primeira relação sexual e número de parceiros ao longo da vida) e aqueles relacionados à situação socioeconômica e a idade (ENTIAUSPE et al., 2014). Recentes estudos mostram que mulheres com menos de 30 anos são as mais acometidas pelo vírus HPV (NASCIMENTO et al., 2018; YOU et al., 2017).

Segundo Assoumou et al. (2016), foi observado que o comportamento sexual é o fator de risco predominante nas infecções por HPV, especialmente naqueles com múltiplos parceiros sexuais (≥ 3). Na amostra desta pesquisa, 64,6% das mulheres tiveram de 1 a 2 parceiros durante a vida sexual, assim como a maioria das mulheres eram casadas (64,6%), nosso dado demonstrou que na população estudada o comportamento sexual não conferia risco.

Neste estudo foi padronizada a técnica de RT-PCR utilizando fluorescência por *SYBR Green* para diagnóstico do HPV utilizando controle interno de β -globina. A T_m do controle positivo variou de 79,2°C - 82,48°C utilizando os *primers* consenso MY09-11. Estudos anteriores também encontraram a T_m parecida, em que Dinc et al. (2010) encontraram T_m de 78-82°C e Sahiner et al. (2014) encontraram T_m entre 79-83°C.

Os genótipos de HPV com maior associação com o câncer de colo de útero e de neoplasias intra-epiteliais são HPV-16 e HPV-18, responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical e 50% das lesões de alto grau (CASTLE et al. 2008; LEITZ et al., 2014; WHO, 2018). Diversos estudos no Brasil afirmam ainda que o HPV 16 é o mais prevalente dentre os genótipos de alto-risco, o que intensifica a preocupação referente à saúde pública brasileira. Os tipos HPV-6 e HPV-11 são os responsáveis por 90% dos condilomas genitais e papilomas laríngeos e são considerados de baixo risco oncogênico (GADELHA et al., 2017; OLIVEIRA et al. 2017).

A padronização da genotipagem de HPV-16 e HPV-18 pela técnica de RT-PCR, utilizando fluorescência por SYBR Green, determinou-se uma T_m 78,01 °C para HPV-16 e uma T_m de 80,25 °C para HPV-18. Em outro estudo, utilizando a mesma técnica, os autores encontraram uma T_m entre 81–85 °C para HPV-16 e HPV-18 (SAHINER et al., 2014).

Para poder afirmar que um resultado é negativo, deve-se ter a certeza de que a ausência de amplificação é devido à ausência de DNA molde, e não quando existe falhas na reação. Para tanto, utiliza-se o controle de amplificação ou controle interno nas reações. As bandas-controle nas reações de PCR são geradas a partir da amplificação de uma sequência que obrigatoriamente existe no material analisado. Vários genes são utilizados para amostras de humanos sendo os genes da β -globina e 2 β -actina os mais usados (VENCESLAU, et al., 2014). No presente estudo foi possível amplificar o controle interno β -globina na reação de diagnóstico de HPV e na reação da genotipagem do HPV-16, o que não foi possível nas genotipagens do HPV-18 e do HPV-6/11. Reações com outro gene humano serão testadas futuramente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram padronizadas as técnicas de RT-PCR para diagnóstico e genotipagem com controle interno e testadas em 99 amostras cérvico-vaginais. As amostras testadas foram negativas para HPV utilizando a técnica padronizada. Concluiu-se que foi possível padronizar a técnica de RT-PCR para diagnóstico HPV e genotipagem de HPV-16 com controle interno.

REFERÊNCIAS

- ABREU A. L. P. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*, v. 9, n. 262, 2012.
- ASSOUMOU, Z. S. et al. Human papillomavirus genotypes distribution among Gabonese women with normal cytology and cervical abnormalities. *Infectious Agents and Cancer*, v. 11, n. 1, 2016.
- 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.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: *Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. *Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero*. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. HPV e câncer: Perguntas mais frequentes. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>. Acesso em: 2 fev. 2018.

BRINGHENTI, M. E. Z. et al. Prevenção do Câncer Cervical: Associação da Citologia Oncótica a Novas Técnicas de Biologia Molecular na Detecção do Papilomavírus Humano (HPV). *DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 22, n. 3, p. 135-140. 2010.

CAMARGO M. et al. Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *Journal of Virological Methods*, v. 178, p. 68– 74, 2011.

CASTLE P. E. et al. Comparison of Two PCR-Based Human Papillomavirus Genotyping Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 10, p. 3437–3445, 2008.

DEPUYDT C. E. et al. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. V. 11, n. 4, p. 881-891. 2007.

DINC, B. et al. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) e HPV-16 genotipagem por PCR em tempo real em pacientes com diversas patologias cervicais. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 14, n. 1, p. 19-23, 2010.

ENTIAUSPE, L. G et al. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014.

ERMAL A. et al. Invasive cervical cancers from women living in the United States or Botswana: differences in human papillomavirus type distribution. *Infectious Agents and Cancer*, v. 9. n. 22, 2014.

GADELHA, S. R. et al. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HPV infection in a low-income population from South Bahia, Brazil. *Epidemiology and Infection*, v. 145, n. 16, p. 3398-3404, 2017.

LEITZ, J. et al. Oncogenic Human Papillomaviruses Activate the Tumor-Associated Lens Epithelial-Derived Growth Factor (LEDGF) Gene. *PLoS Pathogens*, v. 10, p. 3, 2014.

LORENZI A. T. et al. Self-collection for high-risk HPV detection in Brazilian women using the careHPV™ test. *Gynecologic Oncology* v. 131, p. 131–134, 2013.

LUU, N. H. et al. Comparing the Performance of Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Identification of Cervical Dysplasia in the Screening and Diagnostic Settings. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, v. 7, p. 247–255, 2013.

MAGALHÃES, I. M. et al. Comparação de dois pares de oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase para detecção de Papilomavírus humanos em esfregaços cervicais. *DST - Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v. 20, n. 2, p. 93-98, 2008.

MAHONY J. B. et al. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 1753-1758, 1993.

MANOS M. M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*. v. 7, p.209-214,1989.

MÜLLER, E. E. et al. The prevalence of human papillomavirus infections and associated risk factors in men-who-have-sex-with-men in Cape Town, South Africa. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, 2016.

NASCIMENTO, M. D. D. S. B. et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. *BMC Women's Health*, v. 18, n. 1, 2018.

OLIVEIRA, G. R. et al. Human papillomavirus type distribution and HPV16 intratype diversity in southern Brazil in women with and without cervical lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 7, p. 492-498, 2017.

QU W. et al. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP51/GP61 Primer Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1304–1310, 1997.

SAHINER F. et al Detection of major HPVs by a new multiplex real-time PCR assay using type-specific primers. *Journal of Microbiological Methods* V.97, p. 44-50, 2014.

SCHMITT M. et al. Abundance of Multiple High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Infections Found in Cervical Cells Analyzed by Use of a Ultrasensitive HPV Genotyping Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. V. 48, n. 1, p. 143–149, 2010.

SONG, B. et al. Incidence and mortality of cervical cancer in China, 2013. *Chinese Journal of Cancer Research*, v. 29, n. 6, p. 471-476, 2017.

VENCESLAU, E. M. et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 50, n. 4, p. 280-285, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Comprehensive Cervical Cancer Control – A Guide to Essential Practice, 2nd edn. 2014; 364 pages
(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf) Acesso em 2 fev 2018.

YOU, W. et al. Epidemiological study of high risk human papillomavirus infection in subjects with abnormal cytological findings in cervical cancer screening. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017.