

PRINCIPAIS TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Emily Francini Silva Do Carmo¹; Adriana Fiorini¹

RESUMO

Existe atualmente grande preocupação com a melhoria no diagnóstico da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), pois este vírus tem sido responsável pela principal doença sexualmente transmissível de etiologia viral e apresenta correlação com os processos malignos e lesões precursoras em cérvix uterina. Neste trabalho são apresentadas as principais técnicas de detecção molecular para o diagnóstico do HPV atualmente disponíveis, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a Captura Híbrida e a Hibridização In Situ, com maior ênfase na PCR. É também discutida a sensibilidade das técnicas moleculares como PCR e PCR em Tempo Real para detecção destes vírus nos tecidos epiteliais antes mesmo do aparecimento de lesões ou sintomas. Com este trabalho foi possível verificar que a técnica de PCR, em relação aos demais testes disponíveis, tem uma maior sensibilidade, sendo capaz de detectar uma reduzida quantidade de amostras e também permitir a verificação de infecções por múltiplos subtipos, bem como avaliar o risco oncogênico da população viral infectante.

Palavras-chave: HPV; Neoplasia; PCR; PCR em Tempo Real

PRINCIPAL MOLECULAR TECHNIQUES FOR DETECTING HUMAN PAPILLOMAVIRUS

ABSTRACT

Nowadays, there is a great concern with the development of HPV (Human Papillomavirus) virus infection diagnosis. HPV virus has been responsible for main sexually transmissible diseases of viral etiology and shows correlation with malignant processes and precursory lesions in uterine cervix. This research shows the main actually available techniques of molecular detection for HPV diagnosis, as PCR (Polymerase Chain Reaction), Hybrid Capture and In Situ Hybridization, giving emphasis to PCR. It also discusses about the sensibility of molecular assays as PCR and Real Time PCR for HPV detection in epithelial tissues before the occurrence of lesions or symptoms. This study has shown that PCR technique, when compared to other available detection tests, has superior sensibility. This technique is also able to detect a reduced amount of samples and it allows the verification of infections by multiple virus subtypes, as well as the evaluation of oncogenic risk of viral infecting population.

Key words: HPV; Neoplasm; PCR; Real Time PCR.

INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV), um vírus da família "Papovaviridae", possui DNA circular, infecta o epitélio escamoso do trato genital, anal e perianal, mucosa da laringe, entre outros tecidos. Este vírus apresenta mais de 100 genótipos (1), dos quais grande parte está relacionada a processos malignos e lesões precursoras em cérvix uterinas (2). O HPV é associado a um subgrupo de carcinoma vulvar e atua por meio do desenvolvimento de uma lesão precursora, a neoplasia intra-epitelial vulvar (NIV) (3).

Estudos baseados em dados epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e moleculares indicam a existência de uma categoria de carcinoma escamoso vulvar que está relacionado à doença sexualmente transmissível, oncogênica, causada pelo HPV. Esta classe de tumores vulvares está

freqüentemente associada a carcinomas escamosos genitais de outros locais, principalmente o cervical (3,4). Estes tumores ocorrem com maior freqüência em mulheres com idade inferior a 65 anos. Existem evidências de que dois tipos histológicos distintos de carcinomas escamosos, denominados verrucóides e basalóides estão presentes preferencialmente neste grupo de carcinomas vulvares (3). Dados obtidos durante os últimos 20 anos confirmam a hipótese de que o carcinoma escamoso da vulva origina-se a partir de pelo menos duas vias patogenéticas. Uma consiste em fatores imunológicos, idade e consumo de cigarros e a outra a infecção pelo papilomavírus humano, originando uma lesão precursora do carcinoma escamoso vulvar, a qual, em uma proporção de mulheres, progride para carcinoma invasivo. Considerando-se dados morfológicos e clínicos, aproximadamente 30% de carcinomas vulvares estão associados com HPV e formas clássicas de NIV (3,4).

Com incidência mundial de cerca de meio milhão de casos por ano – principalmente em países em desenvolvimento – o câncer cervical permanece como um dos mais importantes e danosos cânceres da mulher (2,5). Acredita-se que a infecção viral mais frequentemente transmitida por via sexual seja aquela provocada pelo HPV (2).

Estudos demonstram que o HPV pode ser dividido em 18 tipos, 5 de baixo risco (tipos 6, 11, 42, 43, 44) e 13 de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) sendo que mulheres portadoras do tipos 16 e 18 apresentam significativo risco de desenvolverem processo maligno em cérvix uterina quando comparadas a infecção por outros agentes virais (1,3,6-10). A International Agency for Research on Cancer (IARC) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) consideram os genótipos 16 e 18 do HPV como os agentes etiológicos do carcinoma escamoso do colo uterino (11). O HPV 16 ocorre em aproximadamente 80% dos tumores HPV positivos (3).

É importante salientar que a infecção pelo HPV pode manifestar-se de três formas distintas: clínica (lesões verrucosas, sendo o exame clínico capaz de fazer o diagnóstico); subclínica (suspeitada por alteração na citologia, colposcopia ou no resultado histopatológico de uma biópsia) e a forma latente que corresponde à identificação do vírus pela biologia molecular na ausência de alterações morfológicas (11).

O ciclo viral está associado ao programa de diferenciação da célula epitelial hospedeira. O papilomavírus humano infecta as células basais do epitélio por meio de lesões presentes na mucosa escamosa. Uma vez nas células, a expressão do vírus é controlada e a replicação inicia-se em função da maturação epitelial. Este processo é associado com a expressão de genes estruturais tardios e a produção de capsídeos virais e/ou proteínas tardias (L1 e L2), na superfície epitelial. O fato das células superficiais sofrerem a diferenciação impede a transformação neoplásica. Além disso, as influências regulatórias de algumas unidades de tradução do HPV (E1 e E2), no contexto do ciclo viral normal, podem impedir a transformação neoplásica nas células em replicação (1,3,4).

Papilomavírus associados a câncer, como o HPV 16, não progridem de maneira regular em direção ao processo de maturação viral, acumulando-se no epitélio infectado. Aceita-se que a expressão desregulada de oncogenes virais, especificamente E6 e E7, ocorra na população celular em replicação (células parabasais) e altere irreversivelmente suas características de crescimento. As proteínas E6 e E7 do HPV interagem com proteínas reguladoras do ciclo celular, como o p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb) (3,4).

O estado físico do HPV está diretamente relacionado com o tipo de lesão celular. Em lesões malignas ocorre a integração estável entre o DNA do HPV com o genoma da célula hospedeira, ao contrário das lesões benignas, onde não ocorre esta integração, pois o vírus encontra-se na forma episomal. Diferente da integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, que é aparentemente ao acaso a integração do genoma viral no DNA da célula carcinomatosa hospedeira ocorre sempre entre E1 e E2, resultando na perda ou alteração de E2, enquanto outras regiões do genoma viral permanecem intactas. O produto do gene E2 é uma proteína ligante de DNA que tem um papel indireto na transformação, por meio da regulação da transcrição do promotor de E6/E7 dos HPV 16 e 18. Assim, a integração e a perda da função de E2 resultam na produção excessiva das proteínas E6 e E7. A proteína E1 possui atividade helicase, a qual influencia positivamente a replicação de DNA. Conseqüentemente, a perda funcional de ambos os genes pode contribuir para a perda da função viral normal e para o desenvolvimento de imortalização da célula hospedeira (3,9).

Atualmente existe grande preocupação em torno do aperfeiçoamento dos métodos de detecção citopatológicos do HPV, por isso a introdução de novos critérios de diagnósticos mais sensíveis e específicos, tais como os moleculares, se faz necessário (6). Devido aos resultados rápidos e precisos das técnicas de biologia molecular, é provável que os laboratórios citopatológicos tendem a utilizar estas técnicas como rotina de trabalho e também para a confirmação do diagnóstico por outras técnicas.



O diagnóstico da doença cervical, determinada pela presença de células epiteliais cervicais anormais, normalmente é realizado através do exame de Papanicolau. Este método é considerado muito importante desde os anos 50, porém pode causar alguns problemas como detecção limitada dos precursores do câncer e subjetiva interpretação dos resultados (12). Assim, durante as duas últimas décadas foram estudados métodos adicionais que poderiam melhorar o diagnóstico da doença cervical (13).

A partir do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular torna-se possível identificar, com maior sensibilidade, a presença do DNA do HPV em grande proporção de lesões pré-invasivas e câncer cervical. Considerando a participação feminina em nossa sociedade e economia, é plausível o estudo que vise poupar essa parcela significativa da população de incômodos que podem ser até letais.

Nesta revisão é discutida a sensibilidade das técnicas moleculares como PCR e PCR em Tempo Real, para detecção destes vírus nos tecidos epiteliais antes mesmo do aparecimento de lesões ou sintomas, tornando possível o diagnóstico precoce.

MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DO HPV

Durante os últimos 15 anos o diagnóstico de agentes infecciosos inclui o uso de tecnologias que envolvem os ácidos nucléicos. São várias as tecnologias utilizadas para a detecção do HPV, as quais incluem os imunoenaios e os testes moleculares. As técnicas moleculares promovem contribuição para o diagnóstico de patologias substituindo os métodos indiretos de detecção (pesquisa de anticorpos específicos) ou diretos como o cultivo e isolamento de microorganismos, (que apresentam baixa sensibilidade e longos períodos para sua proliferação in vitro) (14). Neste tópico serão abordados os métodos moleculares mais utilizados para a detecção do HPV, como a captura híbrida, a hibridização in situ e a PCR.

Neste trabalho será dado maior enfoque na detecção molecular do HPV por PCR, por ter sido atualmente considerada a técnica de maior sensibilidade.

Captura Híbrida

O teste por captura híbrida é designado para detectar 18 tipos de HPV divididos em grupos de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e baixo risco (tipos 6, 11, 42, 43 e 44), (10,15). Este método é baseado no uso de microplaca e solução hibridizadora que contém anticorpos monoclonais para captura com amplificação de sinal, sendo que a presença do vírus é detectada pela quimioluminescência (6,11,16-18). O material contendo DNA hibridiza-se com o coquetel de sonda específico de RNA-HPV, assim ocorre a formação de híbridos RNA/DNA, que são capturados sobre a superfície da microplaca sensibilizada com anticorpos específicos para os híbridos RNA/DNA. Os Híbridos imobilizados reagem com a fosfatase alcalina conjugada com anticorpos específicos para híbridos RNA/DNA e são detectados por quimioluminescência ultra-sensível (16). Os valores lidos por um quimioluminômetro são transmitidos a um computador, dotado de software específico, que analisa os números recebidos e faz os cálculos de validação do ensaio e a quantificação dos controles positivos, negativos e amostras. Os testes de captura híbrida são ao mesmo tempo qualitativos e quantitativos (6,11,16-18).

Desenvolvido para prover estimativas quantitativas de carga viral, o ensaio de captura híbrida é um método seguro, preciso e reprodutível para o teste de HPV (12).

Hibridização in situ

É uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA em cortes de tecido ou preparados citológicos, utilizando-se uma seqüência complementar de ácidos nucléicos marcados com sondas. Sob condições apropriadas, ocorre a hibridização (através do estabelecimento de pontes de hidrogênio) da sonda com a seqüência-alvo do DNA viral, que pode ser visualizada através de marcadores fluorescentes ou radioativos, que são ligados às sondas permitindo a detecção e

localização de seqüências de ácidos nucléicos do HPV em material citológico e histológico (19). A hibridização *in situ* com sondas marcadas com fluorescentes, FISH (Fluorescence *In Situ* Hibridization) é o método de hibridização *in situ* mais utilizado atualmente, por não utilizar marcação radioativa.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As técnicas de biologia molecular e a engenharia genética progrediram muito nas últimas décadas, em especial a partir da década de 60, quando o DNA teve a sua estrutura descrita (20). Em 1985, Kary Mullis (20) desenvolveu a estratégia para se amplificar um alvo genômico mediante a replicação do DNA *in vitro*. Esta técnica, denominada PCR, é executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células, possibilitando a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima Taq DNA polimerase. Quando um par de oligonucleotídeos (iniciadores) se liga ao DNA alvo, a enzima Taq DNA polimerase sintetiza uma seqüência complementar de DNA, a partir da extremidade 3' OH livre do primer. Os iniciadores definem a seqüência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada seqüência de DNA com bilhões de cópias (20).

O ensaio da PCR é uma técnica utilizada em testes clínicos para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos (21), podendo ser considerada a mais sensível na identificação do DNA do HPV nos mais diferentes materiais clínicos. A detecção por PCR pode ser qualitativa indicando a presença do microorganismo em questão ou quantitativa, a qual pode avaliar a quantidade de material genético em uma amostra biológica. Os métodos de diagnóstico para a infecção por HPV baseados em PCR têm a maior sensibilidade de detecção dos genomas virais, quando comparados com outras metodologias (22).

Por intermédio da PCR é possível detectar e identificar o material genômico dos HPVs, o que permite saber se o vírus é de alto ou baixo risco oncogênico. Assim, o diagnóstico por PCR representa um complemento importante aos diagnósticos

cito-histopatológicos e colposcópicos (14). Atualmente existem várias modificações da técnica de PCR convencional, sendo as principais a PCR em Tempo Real ou Q-PCR (PCR quantitativa), RT-PCR (PCR por Transcrição Reversa, para se amplificar amostras de RNA) e a PCR Multiplex, a qual pode ser aplicada para a amplificação de vários loci em uma mesma reação.

Para a detecção de HPV, a Q-PCR promove uma análise qualitativa e quantitativa, o que permite a estimativa da carga viral de uma amostra biológica. Esta técnica difere da PCR convencional por utilizar sondas marcadas com fluoróforos que emitem uma fluorescência durante as amplificações, e o sinal é detectado por um laser do termociclador. O resultado pode ser visualizado em uma tela de computador. As sondas mais utilizadas são TaqMan®, Molecular Beacons e o corante intercalante SYBR® Green (20, 23).

A PCR convencional pode ser considerada o método mais sensível disponível, mas possui algumas limitações, assim, como a Captura Híbrida, não é possível quantificar de maneira significativa a carga viral. Devido a alta sensibilidade do método de PCR podem ocorrer resultados falso-positivos ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado (24). Esta restrição pode ser evitada com o uso da Q-PCR (23,25). A Q-PCR realiza a quantificação dos ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade. Possibilita maior facilidade na quantificação, possui maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, e maior velocidade na análise (20). A liberação de fluorescência a cada ciclo de amplificação é diretamente proporcional a quantidade de amplicon gerada, sendo considerado um método preciso de avaliar a carga viral e é projetado para manter a contaminação a um mínimo (17).

A sensibilidade e especificidade do método PCR pode sofrer variações dependendo dos primers, do tamanho de produto da PCR, desempenho da DNA polimerase utilizada na reação e da quantidade de DNA do HPV amplificado (17).

Os produtos amplificados por PCR podem ser clivados com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos são comparados para identificação do subtipo viral, o que permite



classificar seu grau de risco. Este método apresenta vantagens em relação aos demais testes disponíveis, pois enquanto nos outros métodos o poder de detecção é de no máximo uma partícula viral em cada 10 células normais, a PCR é capaz de detectar 1 partícula viral em cada 1000 células; a técnica permite, também, verificar infecções por múltiplos tipos e avaliar o risco oncogênico da população viral infectante (26).

Deve-se ressaltar o fato de que todos os conjuntos de diagnóstico apresentam características intrínsecas que podem conduzir a resultados falsos. A sensibilidade do teste e outras causas de ordem técnica são apontadas como fatores que contribuem para o aparecimento de resultados falso-negativos, como: a troca da amostra, o uso de reagentes fora do prazo de validade, a utilização de equipamentos desajustados, pipetagem incorreta e o transporte ou armazenamento inadequado das amostras ou dos kits.

No entanto a análise do DNA do HPV por PCR tem um baixo valor falso-negativo para prever lesões cervicais relacionadas com HPV. Em um estudo realizado por Zazove et al. (28) pouquíssimas mulheres com lesões cervicais relacionadas com HPV em uma população de baixo risco não foram diagnosticadas pela técnica de PCR, indicando que existe uma razão muito baixa de resultados falso-negativos.

A tabela 01 mostra duas seqüências de iniciadores que podem ser utilizados para se amplificar as seqüências específicas dos tipos 16 e 18 do HPV.

Tabela 01. Seqüências de iniciadores relacionados aos tipos 16 e 18 do HPV

Tipos de HPV	Iniciadores	Posição de ligação ao DNA
HPV 16 (23)	Fwd 5'-GGTCGGTGGACCGGTCGATG3'	389 a 408
	Rev 5'-GCAATGTAGGTGTATCTCCA3'	465 a 484
HPV 16 (7)	Fwd 5'-CGTAACCGAAATCGGTTGAA3'	31 a 50
	Rev 5'-TCCTGTGGGCTCTGAAAG3'	106 a 123
HPV 18 (23)	Fwd 5'-CCTTGGACGTAATTTTGG3'	7004 a 7023
	Rev 5'-CACGCACACGCTTGGCAGGT3'	7100 a 7119
HPV 18 (7)	Fwd 5'-CGGACCGAAAACGGTGTGA3'	54 a 72
	Rev 5'-CGTGTGGATCTCAAAGG3'	112 a 130

GENOTIPAGEM DO HPV POR PCR

Para a detecção do DNA do HPV são utilizados iniciadores consensos, MY09/MY11 (27): 5'CGTCCMAARGGAWACTGATC3' e 5'GCMCAGAWCATA AYAATGG3' respectivamente, pois são capazes de identificar vários tipos de HPV em uma única reação de PCR (29). Estes iniciadores amplificam especificamente uma parte do gene L1, que é a região mais conservada do genoma dos diferentes tipos de HPV, codificando uma proteína do capsídeo viral. Estes iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases do gene L1, tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV (2,16,17,22,23,25).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com vários estudos, mulheres com infecção cervical por HPV podem desenvolver neoplasia, assim torna-se importante a precocidade diagnóstica.

Pesquisas realizadas em diferentes condições mostram que todas as técnicas moleculares citadas neste trabalho são importantes e eficientes no diagnóstico do HPV, mas a PCR vem sendo considerada a técnica com maior sensibilidade, especificidade e velocidade de análise, podendo assim ser considerado método molecular de escolha para o eficiente diagnóstico do HPV.

Recebido em 13/03/07
 Revisado em 12/04/07
 Aceito em 18/05/07

Adriana Fiorini ¹

*Endereço para correspondência*¹:

Cesumar- Centro Universitário de Maringá- Av. Guedner,
 1610; CEP: 870050-390; Maringá-PR; Telefone: (44) 3027-
 6360 ramal 138;

e-mail: emilyfrancini@hotmail.com
fiorini@cesumar.br

REFERÊNCIAS

- (1) MAHDAVI, A.; MONK, B. J. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. **The Oncologist**, USA, v. 10, p. 528-538, 2005.
- (2) NORONHA, V.; MELLO, W.; BRITO, A. et al. Papilomavirus humano associado a lesão de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, MG, 1999, v. 32, n. 3, p. 235-240.
- (3) PINTO, P. A. Etiopatogenia do Câncer Vulvar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, 2002, v. 38, n. 1, p. 55-58.
- (4) FEDRIZZI, E. N.; CARVALHO, N. S.; VILLA, L. L. et al. Pesquisa da Prevalência Papilomavirus Humano em Amostras de Tecido Endometrial Normal e com Carcinoma pela Técnica de PCR. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, RJ, 2004, v. 26, n. 4, p. 277-287.
- (5) ALEIXO, A. N. Aspectos epidemiológicos do câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, SP, 1991, v. 25, n. 4, p. 326-333.
- (6) JORDÃO, A. V.; RUGGERI, L. S.; CHIUCHETA, G. I. R. et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, v. 39, n. 1, p. 81-89, 2003.
- (7) SÖDERLUND-STRAND, A.; RYMARK, P.; ANDERSSON, P. et al. Comparison between the Hybrid Capture II Test and a PCR-Based Human Papillomavirus Detection Method for Diagnosis and Posttreatment Follow-Up of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, 2005, v. 43, n. 7, p. 3260-3266.
- (8) GABRIEL, M.; TORMENA, E. B.; SOUZA, R. J. S. Comparação entre teste de detecção de DNA do Papilomavirus Humano pelo sistema de Captura Híbrida com citologia em esfregaços cervicais. **Sabios: Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, PR, 2006, v. 1, n. 1, p. 23-30.
- (9) MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L. et al. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **Kobe Journal of Medical Sciences**, Kobe, Japan, 2004, v. 50, n. 1, p. 9-19.

- (10) CARVALHO, M. O. O.; CARESTIATO, F. N.; PERDIGÃO, P. H. et al. Human Papillomavirus Infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective Study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, Bahia, 2005, v. 9, n. 5, p. 398-404.
- (11) BORGES, S. C. V.; MELO, V. H.; MORTOZA, G. J. et al. Taxa de detecção do papilomavírus humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, RJ, 2004, v. 26, n. 2, p. 105-110.
- (12) CARVALHO, M. O. O.; ALMEIDA, R. W.; LEITE, F. M. S. et al. Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, Bahia, 2003, v. 7, n. 2, p. 121-125.
- (13) CAETANO, R.; VIANNA, M. M.; THULER, L. S. et al. Custo-efetividade no diagnóstico precoce do câncer de colo uterino no Brasil. **Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, RJ, 2006, v. 16, n. 1.
- (14) <http://www.biometrix.com.br/htmls/ajuda/faq-symbiosis.asp>. Diagnóstico de doenças infecciosas por Biologia Molecular – Symbiosis. Acesso em: 19 set. 2006.
- (15) AZIZ, M. T. A.; AZIZ, M. Z. A.; ATTA, H. M. et al. Screening for human papillomavirus (HPV) in Egyptian women by second-generation hybrid capture (HCII) test. **Medical Science Monitor**, New York, USA, 2006, v.12, n. 7, p. 43-49.
- (16) NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L. et al. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, SP, 2002, v. 36, n. 1, p. 95-100.
- (17) IFTNER, T.; VILLA, L. L. Human Papillomavirus Technologies. **Journal of National Cancer Institute Monographs**, USA, 2003. n. 31.
- (18) MALLOY, C.; SHERRIS, J.; HERDMAN, C. HPV DNA Testing: Technical and Programmatic Issues for Cervical Cancer Prevention in Low-Resource Settings. **Path**, USA, p.1-29, 2000.
- (19) BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavirus Humano por Hibridização in situ em lesões Intra-epiteliais do Colo Uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, RJ, 2004, v. 26, n. 1, p. 59-64.
- (20) NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, 2004, n. 33, p. 10-13.
- (21) KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico Molecular da Toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, RJ, 2005, v. 41, n. 4, p. 229-235.
- (22) KANESHIMA, E. N.; BIDOIA, C. C. G.; GABRIEL, M. et al. Aplicação do Método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, 2001, v. 23, n. 3, p. 731-737.
- (23) BIEDERMANN, K.; DANDACHI, N.; TRATTNER, M. et al. Comparison of Real-Time PCR Signal-Amplified in Situ Hybridization and Conventional PCR for Detection and Quantification of Human papillomavirus in Archival Cervical Cancer Tissue. **Journal of Clinical Microbiology**,



Washington, USA, 2004, v. 42, n. 8, p. 3758-3765.

(24) PALAZZI, M. A.; ERWENNE, C. M.; VILLA, L. L. Detection of human papillomavirus in epithelial of the conjunctiva. São Paulo Medical Journal/ **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, SP, 2000, v. 118, n. 5, p. 125-130.

(25) NELSON, J. H.; HAWKINS, G. A.; EDLUND, K. et al. A Novel and Rapid PCR-Based Method for Genotyping Human Papillomaviruses in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, 2000, v. 38, n. 2, p. 688-695.

(26) http://www.genesisdbm.com.br/descricao_papilomahumano_genotipagem.shtml. Vírus do Papiloma Humano (HPV) Genotipagem. Acesso em: 15 set. 2006.

(27) SPINILLO, A.; DEBIAGGI, M.; ZARA, F. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1-Related Nucleic Acids and Papillomavirus DNA in Cervicovaginal Secretions of Immunodeficiency Virus-Infected Women. **AIDS-Official Journal of the International AIDS Society**, Italy, v. 97, n. 6, p. 999-1004, 2001.

(28) ZAZOVE, P.; REED, B. D.; GREGOIRE, L. et al. Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus-related cervical lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, 1998 V. 36, n. 9, p. 2708-2713.

(29) RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, SP, 2006v. 20, n. 1, p. 21-40.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.