

SÉRGIO FERREIRA DE LIMA JÚNIOR<sup>1</sup>  
MAYARA COSTA MANSUR FERNANDES<sup>2</sup>  
SANDRA DE ANDRADE HERÁCLIO<sup>3</sup>  
PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA<sup>4</sup>  
MARIA DE MASCENA DINIZ MAIA<sup>5</sup>

# Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil

*Prevalence of human papillomavirus genotypes: comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil*

## Artigo original

### Palavras-chave

Neoplasia intra-epitelial cervical  
HPV/diagnóstico  
Prevalência  
Genótipo  
Biologia molecular

### Keywords

Cervical intraepithelial neoplasm  
HPV/diagnosis  
Prevalence  
Genotype  
Molecular biology

### Resumo

**OBJETIVO:** comparar três métodos para detecção do HPV e determinar a prevalência dos genótipos encontrados. **MÉTODOS:** um total de 120 amostras de raspagem da região cervical de mulheres portadoras de neoplasia intraepitelial cervical foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase convencional, usando os sistemas de primers MY09/11, GP05+/06+ e pela *Nested-PCR*. As amostras foram submetidas à extração de DNA e, logo após, amplificadas com os primers GH20 e PC04 ( $\beta$ -globina) para verificação da qualidade do DNA obtido e pela reação em cadeia da polimerase convencional e *Nested-PCR*. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,2%, corados com *Blue Green Loading Dye I*. As amostras positivas foram sequenciadas usando o sequenciador automático de DNA "MegaBACE 1000". Para análise estatística foram utilizados os teste do  $\chi^2$  e o de Fisher com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** quinze amostras não se amplificaram para os primers de  $\beta$ -globina, sendo eliminadas do estudo. Das amostras restantes, 40% (42/105) foram positivas para os primers MY09/11, 98% (103/105) para os primers GP05+/06+ e 92% (97/105) para *Nested-PCR*. Considerado as técnicas MY09/11 e GP05+/06+, foi possível observar 100% de amostras positivas para o HPV. Neste estudo, a prevalência dos genótipos foi de 58, 23, 5, 4 e 3% para HPV 16, 18, 31, 33 e 56, respectivamente. Os HPV 67 e 83 apresentaram 2% e os HPV 6, 11, 58 e *condHPV85*, 1% cada. A prevalência dos genótipos neste estudo está de acordo com o reportado em todo o mundo (IC95%=0,4657–0,8976). **CONCLUSÕES:** para obter resultados mais confiáveis, é necessário o uso de mais que um sistema de primers para detecção do HPV. Acredita-se que as três técnicas estudadas são importantes e adequadas para o diagnóstico clínico do HPV quando apropriadamente combinadas.

### Abstract

**PURPOSE:** to compare three methods for the detection of HPV infection and to determine the prevalence of the genotypes found. **METHODS:** a total of 120 cervical scrape samples from patients with cervical intraepithelial neoplasia were analyzed by the conventional polymerase chain reaction using the MY09/11 and GP05+/06+ primers, and by the Nested polymerase chain reaction. The samples were subjected to DNA amplification with the GH20 and PC04 primers ( $\beta$ -globin) to verify DNA quality and also by polymerase chain reaction and Nested polymerase chain reaction. The amplicons were visualized in 1.2% agarose gel stained with *Blue Green Loading Dye I*. Positive samples also were sequenced using the automatic DNA sequencer "MegaBACE 1000". The  $\chi^2$  and Fisher tests were used for statistical analysis with the level of significance set at 5%. **RESULTS:** fifteen samples were eliminated from the study because they failed to amplify the  $\beta$ -globin gene. Of the remaining samples, 40% (42/105) were positive using primers MY09/11, 98% (103/105) using primers GP05+/06+, and 92% (97/105) using *Nested-PCR*. With the MY09/11 and GP05+/06+ techniques, it was possible to obtain 100% HPV-positive samples. In this study, the prevalence of the genotypes found was 57, 23, 5, 4 and 3% for HPV genotypes 16, 18, 31, 33 and 56, respectively. HPV 67 and 83

### Correspondência:

Maria de Mascena Diniz Maia  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos  
CEP: 52171-900  
Recife (PE), Brasil

### Recebido

26/08/2011

### Aceito com modificações

28/10/2011

Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA Professora Tânia Falcão da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

<sup>1</sup> Pós-graduando pelo Programa de Pós-graduação do Laboratório Keizo Asami – LIKA – da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife (PE), Brasil.

<sup>2</sup> Pós-graduanda pelo Programa de Pós-graduação do Laboratório Keizo Asami – LIKA – da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife (PE), Brasil.

<sup>3</sup> Médica do Centro de Atenção à Mulher do Departamento de Patologia do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP – Recife (PE), Brasil.

<sup>4</sup> Professor Doutor do Departamento de Biologia, Área de Genética, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

<sup>5</sup> Professora Doutora do Departamento de Biologia, Área de Genética, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE – Recife (PE), Brasil.

Conflito de interesses: nada a declarar.

were present in 2%, and genotypes 6, 11, 58 and *candHPV85* were present in 1% each. The prevalence of the more common genotypes (HPV 16 and 18) in this study agrees with that reported worldwide (IC95%=0.4657–0.8976). **CONCLUSIONS:** to obtain more reliable results, it is necessary the use of more than one primer system to detect HPV infections. We believe that the three techniques studied are important and suitable for the clinical diagnosis of HPV, when they are appropriately combined.

## Introdução

O HPV é o agente causal de muitas doenças epiteliais e mucosas, incluindo as verrugas genitais, considerada a doença mais comum ocorrente entre a população sexualmente ativa, bem como, virtualmente, os casos do segundo tipo mais comum de câncer, o cervical, que comumente são causados por infecções persistentes por genótipos de HPV de alto risco oncogênico<sup>1,2</sup>.

O câncer cervical é o tipo mais comum nos países em desenvolvimento e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. A estimativa de novos casos de câncer cervical por ano é de 500.000, 80% dos quais ocorrem em países em desenvolvimento<sup>3</sup>. Nas Américas Central e do Sul, a taxa de incidência é cerca de cinco vezes maior do que na Europa Ocidental<sup>4</sup>.

No Brasil, o câncer cervical é o segundo tumor mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Mais de 150 tipos de HPV já são conhecidos até atualmente com base em diferenças genômicas na sequência do DNA, destes, 85 genótipos foram totalmente caracterizados<sup>4</sup>. Existem aproximadamente 40 tipos conhecidos de HPV genital, os quais são mais comumente divididos em HPV de alto e de baixo riscos, relacionando-se ao risco de desenvolvimento do câncer cervical<sup>1</sup>.

Os tipos 16 e 18 são os principais responsáveis pelo câncer cervical (mais de 70% nas áreas geográficas), seguidos pelos tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58<sup>5</sup>. Os tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 e 58 também podem ser associados com lesões pré-malignas<sup>6</sup>. Avanços tecnológicos nos métodos diagnósticos permitiram detectar um grande número de indivíduos infectados, com consequente risco para o desenvolvimento de neoplasias<sup>7</sup>.

O diagnóstico molecular da infecção pelo HPV é fundamental para a triagem do vírus e baseia-se, principalmente, nos seguinte métodos: reação em cadeia da polimerase (PCR), usando *primers consensus*; captura híbrida – 2 (HC2, Digene Co., Gaithersburg, MD, USA)<sup>8</sup>; *southern blot*, hibridização *in situ*. A PCR se baseia na amplificação específica dos seguimentos do DNA-alvo e tem potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos, mesmo em infecções não-produtivas<sup>9</sup>.

O *Nested-PCR* se baseia em duas etapas: a primeira é similar à PCR convencional, na qual utiliza-se um par de *primers* que amplificará uma região específica do DNA, resultando em fragmentos amplificados do gene escolhido. A segunda parte consiste em utilizar *primers* internos a essa região já amplificada, ou seja, outra reação de PCR que tem como alvo uma sequência contida nos fragmentos anteriormente amplificados, reduzindo o índice de bandas inespecíficas e aumentando a sensibilidade, especificidade e eficiência do método. Os protocolos mais amplamente utilizados empregam iniciadores consenso e degenerados complementares a uma região altamente conservada do gene L1, e que são potencialmente capazes de discriminar os tipos de HPV que infectam as mucosas. Entre estes, estão: o par único de iniciadores consenso GP05/06 e sua versão estendida GP05+/06+<sup>10</sup>, e os iniciadores degenerados MY09/11<sup>11</sup>.

A sensibilidade analítica e a especificidade dos testes de HPV variam amplamente, dependendo das características do ensaio, do tipo e da qualidade da amostra biológica e do tipo da qualidade dos reagentes empregados, incluindo o uso de diferentes DNA polimerases que afetam o desempenho do teste. Além disso, deve-se ter cuidado ao interpretar comparações, pois os métodos diferem na habilidade para detectar diferentes tipos de HPV, tais como infecções por um ou múltiplos tipos de HPV<sup>12</sup>.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar a detecção da infecção por HPV utilizando três metodologias, com a finalidade de comparar e propor àquela que detecta e fornece resultados mais confiáveis. Adicionalmente, determinou-se a prevalência dos genótipos de HPV encontrados nas amostras analisadas.

## Métodos

### Amostras

As amostras foram coletadas por raspagem da região cervical, com o auxílio de escovas do tipo *cytobrush* adequada, de 120 mulheres atendidas no Centro de Saúde da Mulher do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e que apresentavam algum tipo de lesão cervical. As escovas foram mantidas em solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH=8,0). O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Nº 355/08), e as pacientes incluídas

concordaram em participar, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

### ■ Extração do DNA

A extração de DNA procedeu-se a partir de 500 µL de secreção vaginal. Para tal, utilizou-se o kit de extração comercial “Wizard Genomic DNA Purification kit” (PROMEGA), segundo protocolo proposto pelo fabricante. Para avaliar a integridade do DNA extraído e a ausência de inibidores, foram realizadas PCR utilizando-se o conjunto de *primers* específicos para β-globina humana, segundo protocolo descrito por Bell et al.<sup>13</sup>. O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado: 94° C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94° C, por 30 segundos; anelamento à 55° C, por 30 segundos; e extensão à 72° C, por 30 segundos; seguidos de uma extensão adicional à 72° C, por oito minutos. O amplicon obtido foi de aproximadamente 250 bp.

### ■ PCR

A infecção por HPV foi diagnosticada pelo uso de dois conjuntos de *primers consensus*. Para cada paciente foram realizadas duas reações, uma delas utilizando-se os *primers* MY09 (5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), descritos por Manos et al.<sup>11</sup>, e outra os *primers* GP05+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP06+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3), descritos por de Roda Husman et al.<sup>10</sup>.

A reação de amplificação, utilizando-se os *primers*, continha um volume total de 15 µL, contendo 1 x de tampão da PCR, 100 µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 pmol/µL de cada *primer* específico (MY09 e MY11), 0,2 U de Taq DNA polimerase e 200 ng de DNA. Para essa reação, utilizou-se o kit “GoTaq® Hot Start Polymerase” (PROMEGA). O seguinte protocolo de amplificação foi utilizado: 94° C por quatro minutos; seguido de 35 ciclos de 94° C, por 30 segundos; 55° C, por 30 segundos; e 72° C, por 30 segundos, seguidos de um ciclo adicional de 72° C por oito minutos. O tamanho do fragmento obtido para essa reação foi de 450 pb.

A amplificação com o sistema GP05+/06+ também foi realizada para um volume final de 15 µL contendo 1 x de tampão da PCR, 200 µM de cada dNTP, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 pmol/µL de cada *primer* específico (GP05+ e GP06+), 1 U de Taq DNA polimerase e 200 ng de DNA. Para essa reação também foi utilizado o kit “GoTaq® Hot Start Polymerase” (PROMEGA). Foi usado o seguinte protocolo de amplificação: 94° C, por quatro minutos; seguido de 35 ciclos de 94° C, por um minuto; 40° C, por dois minutos; e 72° C, por 1,5 minutos; seguido de 72° C por quatro minutos. O fragmento obtido foi de 170 pb.

Para realização da *Nested-PCR*, utilizou-se 1 µL do amplicon obtido por meio da PCR realizada com o conjunto de *primers* MY09/11. A amplificação foi realizada com os *primers* GP05+ e GP06+, utilizando-se as mesmas condições e ciclagens da PCR comum para esses *primers*.

A separação do produto da amplificação foi realizada pela eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC) e visualizado em luz ultravioleta. Os amplicons foram comparados com o marcador de peso molecular *ladder* 100 bp (Promega).

Após a confirmação da positividade das amostras para HPV, realizou-se reações de sequenciamento utilizando-se o kit “DyEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing kit” (GE HealthCare), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram levadas ao sequenciador automático de DNA “MegaBACE 1000 DNA Sequencer”. Ao final do processo, os resultados encontrados foram comparados com os diversos genótipos já encontrados pela plataforma *on-line* BLASTn do *National Center for Biotechnology Information* a fim de determinar os genótipos do HPV encontrados na pesquisa.

### ■ Análise estatística

Foram utilizados o teste do  $\chi^2$  e o de Fisher, ao nível de significância de 0,05, para determinação da concordância entre a prevalência encontrada neste estudo e a mundial dos genótipos de HPV.

## Resultados

Das 120 amostras utilizadas, 15 não obtiveram resultado positivo quando utilizados os *primers* da β-globina humana, logo, as mesmas foram excluídas do estudo.

Utilizando-se o conjunto de *primers* MY09/11, identificou-se a presença de DNA viral em 40% das amostras analisadas. Com os *primers* GP05+/06+, foi possível identificar o DNA viral em 98% das amostras e, quando utilizado o protocolo *Nested-PCR*, observou-se DNA viral em 92% das amostras (Tabela 1). A maior falha de identificação foi observada para os *primers* MY09/11, correspondendo a 60% (Tabela 1).

As amostras analisadas obtiveram resultado positivo para infecção por HPV em pelo menos uma das técnicas utilizadas. Quando combinadas as técnicas de detecção, por meio dos *primers* MY09/11 e GP05+/06+

**Tabela 1.** Comparação entre três métodos de detecção do HPV e suas respectivas eficiências em amostras de DNA, provenientes de raspagem da região cervical de mulheres portadoras de neoplasia intra-epitelial

Método	Deteção	Eficiência (%)	Falha do método (%)
MY09 e MY11	42/105	40	60
GP05+ e GP06+	103/105	98	2
<i>Nested-PCR</i>	97/105	92	8

**Tabela 2. Resultados da combinação dos três métodos utilizados para detecção do HPV**

	Detecção inicial	Detecção acumulada		
		MY09 e MY11	GP05+ e GP06+	Nested-PCR
MY09 e MY11	42/105   40%	X	63/63   100%	55/63   92%
GP05+ e GP06+	103/105   98%	2/2   100%	X	2/2   100%
Nested-PCR	97/105   92%	0/8   92%	8/8   100%	X

**Tabela 3. Genótipos de HPV encontrados nas amostras estudadas pelo método de sequenciamento de DNA**

Genótipos	Casos	Frequência (%)	Frequência acumulada (%)
HPV 16	61	58,2	58,2
HPV 18	24	22,86	81,0
HPV 31	5	4,76	85,8
HPV 33	4	3,81	89,6
HPV 56	3	2,86	92,4
HPV 67	2	1,9	94,3
HPV 83	2	1,9	96,2
HPV 6	1	0,95	97,2
HPV 11	1	0,95	98,1
HPV 58	1	0,95	99,1
candHPV 85	1	0,95	100

independentemente, foi possível identificar a infecção em 100% das amostras analisadas, sem necessidade de utilização do método *Nested-PCR* (Tabela 2).

Verificou-se ainda que, apesar da técnica de detecção que utiliza os *primers* GP05+/06+ ser mais eficiente do que as demais, duas amostras negativas para essa técnica foram positivas quando foram utilizados os *primers* MY09/11 (Tabela 2).

Adicionalmente, as amostras deste estudo foram genotipadas e encontrou-se 11 diferentes genótipos (Tabela 3). A prevalência destes genótipos variou amplamente entre eles, sendo os genótipos HPV 16 e 18 os mais frequentes, correspondendo a mais de 81% dos tipos de HPV encontrados (Tabela 3).

## Discussão

Em um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, com 132 amostras de mulheres portadoras de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), identificou-se a presença do DNA de HPV em 64 amostras, utilizando-se os *primers* MY09/11, correspondendo a 48,5%<sup>14</sup>. Este resultado assemelha-se ao encontrado no presente trabalho, quando foi utilizado apenas o conjunto de *primers* MY09/11. As falhas de amplificação encontradas, quando utilizado o conjunto de *primers* MY09/11, podem ser explicadas pelo fato de que apesar destes *primers* degenerados serem capazes de amplificar uma grande variedade de genótipos, sendo eles de baixo ou alto risco, esse sistema de amplificação apresenta vários níveis de intensidade, podendo até não

se tornarem observáveis quando visualizados em gel de agarose<sup>15</sup>. Apesar da adição de bases degeneradas em determinadas posições dos *primers* representarem, virtualmente, a mesma habilidade para amplificar os diversos genótipos de HPV, isso não garante a mesma habilidade na prática<sup>16</sup>.

Em estudo realizado com 3.607 amostras de pacientes com NIC, provenientes de 25 países, analisou-se com o conjunto de *primers* GP05+/06+. Nessa análise, observou-se que a prevalência de indivíduos infectados foi de 96%, assemelhando-se à de 98,1%, que foi encontrada no presente estudo<sup>17</sup>.

Em 2004, um estudo evidenciou a maior sensibilidade dos *primers* GP05+/06+ em relação aos MY09/11. Ao utilizar amostras orais, os *primers* MY09/11 foram capazes de detectar a presença da infecção por HPV em apenas 2,8% das amostras, enquanto que utilizando os *primers* GP05+/06+, 35,8% das amostras foram consideradas positivas. No mesmo estudo, ao utilizar amostras cervicais, observou-se a detecção de 33,9 e 46,4%, quando detectado utilizando os *primers* MY09/11 e GP05+/06+, respectivamente<sup>18</sup>.

Foi observado um aumento na frequência da identificação de amostras positivas para HPV quando utilizando-se os *primers* GP05+/06+ em adição aos MY09/11 (32 e 19%, respectivamente). Estes resultados confirmaram os encontrados neste estudo, que encontrou 98,1% de positividade na detecção de amostras positivas quando utilizados os *primers* GP05+/06+, se comparado aos 40% usando apenas os *primers* MY09/11. Este aumento provavelmente está relacionado ao tipo de amostra utilizada. Enquanto que neste estudo foram utilizadas amostras de raspagem da região cervical, naquele trabalho foram utilizados tecidos parafinizados, o que prejudica a qualidade do DNA extraído<sup>15</sup>.

Esses trabalhos comprovam a maior sensibilidade dos *primers* GP05+/06+ em relação aos MY09/11. Em ambos os estudos, as amostras amplificadas com MY09/11 foram reamplificadas com os *primers* GP05+/06+. Não obstante, no presente estudo, foram identificadas duas amostras que se apresentaram positivas para os *primers* MY09/11 e não foram positivas quando utilizados os *primers* GP05+/06+. Este resultado indica que o uso de um único método de detecção pode levar a falhas na detecção do HPV, gerando resultados falso-negativos, o que pode subestimar a verdadeira prevalência de HPV em amostras cervicais. Em relação à *Nested-PCR*, os resultados encontrados no presente estudo coincidem com os achados de Zehbe e Wilander, os quais não observaram aumento nos níveis de detecção da *Nested-PCR* quando comparadas com as PCRs realizadas com os *primers* MY09/MY11 e GP05+/GP06+, realizadas em única etapa. Além disso, também foram detectadas amostras que, apesar de serem positivas com os *primers* GP05+/06+, não foram

detectadas por meio do uso de *Nested-PCR*. Este resultado deve-se ao fato dos *primers* MY09/11 apresentarem baixa capacidade de amplificação<sup>19</sup>.

Os genótipos de HPV mais encontrados neste estudo, HPV 16, 18, 31 e 33 com 58,2, 22, 86, 3,81 e 2,86%, respectivamente, estão de acordo com os resultados de uma metanálise realizada a partir de mais de 85 estudos realizados entre fevereiro de 2002 a janeiro de 2006, compreendendo 3.085 amostras de pacientes com lesão cervical, no qual foram observados os genótipos de HPV 16, 18, 33 e 31 com 54,6, 15,8, 4,4 e 3,5%, respectivamente<sup>20</sup>. Esses quatro genótipos corresponderam a 87,7% dos genótipos encontrados neste estudo.

Em um estudo recente, realizado com mulheres que apresentavam alguma alteração celular e submetidas à conização, foram identificadas frequências diferentes das obtidas no presente estudo<sup>21</sup>.

Este resultado demonstra que variações na prevalência do HPV ocorrem não somente entre as populações de diferentes países e continentes<sup>4</sup>, mas também podem variar amplamente entre populações de um mesmo país.

Diante do exposto, é possível concluir que os três sistemas de detecção apresentam falhas ao determinar a

presença da infecção por HPV. Sendo assim, é altamente recomendável o uso de duas ou mais metodologias para determinação da infecção, evitando assim erros provenientes de falhas no processo de detecção. Também é possível inferir que a prevalência dos genótipos mais comumente encontrados neste estudo está de acordo com a prevalência mundial, no qual os genótipos HPV 16 e 18 representaram 81,6% de todos encontrados. No entanto, as frequências dos genótipos de HPV variaram amplamente entre a população pernambucana e a paulista.

Acredita-se que as três técnicas abordadas são importantes e adequadas para o diagnóstico do HPV, quando combinadas. Porém, é necessário que novos estudos demonstrem viabilidade na prática, objetivando a utilização em países em desenvolvimento, como o Brasil, ou em países subdesenvolvidos.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo financiamento do projeto que originou este artigo.

## Referências

- 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):518-27.
- Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol*. 2006;208(2):152-64.
- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001;164(7):1017-25.
- Arossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex*. 2003;45 Suppl 3:S306-14.
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.
- Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H, et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res*. 2000;67(2):127-39.
- 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.
- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs: human papillomaviruses. Lyon: IARC; 2003. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, 64).
- Payan C, Ducancelle A, Aboubaker MH, Caer J, Tapia M, Chauvin A, et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using Mx4000 and Light Cycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):897-901.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76 (Pt 4):1057-62.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In: Furth M, Greaves M, editors. *Molecular diagnostics of human cancer*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. p. 209-14. (Cancer Cells Series, 7).
- Iffner T, Villa LL. Chapter 12: human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):80-8.
- Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GV. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(14):1159-64.
- Silva TT, Guimarães ML, Barbosa MIC, Pinheiro MFG, Maia AF. Identificação de tipos de papilomavírus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(5):285-91.

15. Rughooputh S, Edboo R, Manraj S, Jeebun N, Greenwell P. Detection of human papillomavirus from archival tissues in cervical cancer patients in Mauritius. *J Clin Virol.* 2006;35(2):173-8.
16. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):357-61.
17. Munoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004;111(2): 278-85.
18. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol.* 2004;30(4):302-8.
19. Zehbe I, Wilander E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. *Hum Pathol.* 1996;27(8):812-5.
20. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006;24 (Suppl 3):S26-34.
21. Pitta DR, Campos EA, Sarian LO, Rovella MS, Derchain SFM. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(7):315-20.