



Scientific Electronic Archives (7): 89-95, 2014.

Prevalência de HPV em pacientes assintomáticas no extremo oeste de Santa Catarina

Prevalence of HPV in asymptomatic patients in the extreme west of Santa Catarina

L. Franz ¹; G. R. Weber ¹; C. Dannebrock ²; G. B. Miranda ⁺¹

¹ Universidade do Oeste de Santa Catarina

² Laboratório Prevent, São Miguel do Oeste

+ Address for correspondence: gustavo.miranda@unoesc.edu.br

Resumo

O Papilomavírus humano (HPV) é o vírus sexualmente transmissível mais comum no mundo, sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de colo uterino. O objetivo deste foi observar a sensibilidade em detectar a presença do HPV pela PCR, em amostras de material cérvico-uterino, comparada aos resultados citológicos e determinar qual a prevalência viral em pacientes assintomáticas no extremo oeste catarinense. Para este estudo foram amostradas 496 mulheres residentes na região extremo-oeste catarinense. As amostras passaram por exames citológicos e pela técnica de PCR. Os resultados mostraram, a partir da PCR, que 12,7% das amostras foram positivas para a presença do DNA viral, enquanto que os exames citológicos detectaram alterações celulares em 2,4% das amostras. Os resultados demonstram que o uso de técnicas moleculares para a comprovação da presença do HPV é significativamente mais sensível que os exames citológicos ($P < 0,0001$). A prevalência encontrada no presente estudo ficou dentro do padrão encontrado em outros trabalhos, os quais variaram de 10,6% a 17%.

Palavras-chaves: Técnicas de Diagnóstico Molecular; Colo do Útero; PCR.

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus in the world and is considered a risk factor for developing cervical cancer. The objective of this study was to observe the sensibility to detect the presence of HPV by PCR in samples of cervical material, compared to cytologic results and determine the viral prevalence in asymptomatic patients in the extreme west of Santa Catarina. For this study were sampled 496 women living in the extreme west region of Santa Catarina. The samples underwent cytologic test and the PCR technique. The results showed which 12.7% of samples were positive for the presence of viral DNA by PCR test, while that the cytologic tests detected cellular changes in 2.4% of the samples. The results demonstrate that the use of molecular techniques for proving the presence of HPV is significantly more sensitive than cytological tests ($P < 0.0001$). The prevalence found in this study was within the pattern found in other studies, which ranged from 10.6% to 17%.

Keywords: Molecular Diagnostic Techniques; Cervix Uteri; PCR.

Introdução

O Papilomavírus humano (HPV) é o vírus sexualmente transmissível mais comum no mundo (Carestiato et al., 2006). Estudos comprovam que cerca de 20% dos adultos sexualmente ativos são infectados por um ou mais dos seus 120 (Smith et al., 2008; Bruni et al., 2010). A associação entre HPV e câncer do colo do útero já é bem documentada e atinge mais de 90% das amostras (Bosch et al., 2002; Rama et al., 2008). Cerca de 40 tipos de HPV atingem a região anogenital, dos quais, aproximadamente 18 são oncogênicos: HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 63, 66, 68 e 82. Os demais tipos genitais, HPV 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco ou sem qualquer risco oncogênico (Muñoz et al., 2003). Dentre os casos de câncer cervical, 70% estão relacionados à infecção pelos tipos 16 (55%) e 18 (15%), enquanto os tipos 6 e 11 são encontrados em 90% das verrugas genitais (Smith et al., 2007; Lee et al., 2011).

O HPV é considerado um fator de risco essencial, mas não suficiente para o desenvolvimento de câncer de colo uterino (Noronha et al., 1999; Rama et al., 2008). A este se somam diversos fatores de risco, tais como uso prolongado de anticoncepcionais, hormônios, tabagismo, etilismo, má higiene pessoal, deficiências nutricionais, agentes infecciosos, fatores genéticos, ambientais, reprodutivos, condições sócio-econômicas, dentre outros (Flores et al., 2008; Santana et al., 2008).

As mais recentes estimativas mundiais apontaram 529 mil novos casos de câncer do colo do útero para o ano de 2008, configurando-se o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. Uma provável explicação para as altas taxas de incidência em países em desenvolvimento seria a inexistência ou a pouca eficácia dos programas de rastreamento (Martins et al., 2009). No entanto, com exceção do câncer da pele não melanoma, esse tumor é o que apresenta maior potencial de prevenção e

cura quando diagnosticado precocemente (Jemal et al., 2011).

Embora os programas de triagem cervical tenham reduzido dramaticamente a incidência de câncer do colo uterino, ainda há cerca de 20 a 30% das pacientes cujos resultados são falso-negativos (Carestiato et al., 2006). Resultados de exames citológicos falsos-positivos levam a procedimentos desnecessários e, frequentemente, invasivos, enquanto os resultados falsos-negativos podem causar sérios danos às pacientes. O método citológico possui sensibilidade limitada devido à variabilidade na interpretação dos resultados e à impossibilidade em detectar o vírus HPV propriamente dito, mas apenas as alterações celulares causadas pelo mesmo (Bringhenti et al., 2010). Portanto, um diagnóstico precoce e sensível a partir de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ou a combinação de ambas as técnicas, citopatológico e molecular, são de extrema importância e utilidade para a saúde pública, inclusive na diminuição de custos (Berkhof et al., 2010). Visto que, além de detectar o HPV, a PCR permite a determinação do tipo viral infectante, o que auxilia no tratamento e prognóstico da paciente (Faria et al., 2008).

A prevalência estimada da infecção do HPV pode contribuir com o conhecimento epidemiológico necessário para o fortalecimento e redirecionamento das políticas de controle do câncer do colo do útero. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi observar a sensibilidade em detectar a presença do HPV pela PCR, em amostras de material cérvico-uterino, comparada aos resultados citológicos e determinar qual a prevalência viral em pacientes assintomáticas no extremo oeste catarinense.

Métodos

O estudo contou com a participação de 496 mulheres atendidas no serviço público da Rede Feminina Regional de Combate ao Câncer, no município de São Miguel do Oeste-SC. As mulheres declararam sua participação por meio de termo de consentimento livre e

esclarecimento, depois de informadas quanto aos objetivos, justificativa e procedimentos da pesquisa. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Pesquisa em seres humanos da Universidade do Oeste de Santa Catarina, sob o número de protocolo 142/2011.

Todas as amostras foram testadas com as técnicas de PCR e exame citopatológico. Neste último, os esfregaços foram corados pela coloração de Papanicolau, examinados de modo convencional, sem o conhecimento dos resultados moleculares, e classificados pelo Sistema de Bethesda de 2001 (Solomon et al., 2002). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS e ASC-H), já que não foram encontradas lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL). As amostras que apresentaram padrão normal, alterações inflamatórias ou características de outras infecções foram consideradas negativas.

Para os teste moleculares as amostras foram coletadas por meio de escova cervical e armazenadas em microtubos contendo 1mL de tampão TE (10mM TrisHCl pH 8,5; 1 mM EDTA), conservados a 4°C até o momento da extração de DNA. O material a ser analisado foi concentrado por meio de centrifugação e o sobrenadante descartado. A extração do DNA viral foi possibilitada com uso de proteinase K para lise celular, solução salina (NaCl) para separação entre material genético e proteínas e a precipitação do DNA com álcool absoluto (Weber et al., 2010). Por fim, a amostra isolada foi ressuspensa em água miliQ e mantida a -20°C.

Todas as amostras foram submetidas a uma PCR-Multiplex, com a utilização do conjunto de *primers* consenso MY09 e MY11 para a detecção do material genético do HPV, amplificando uma região de 450 pares de bases (pb) do gene L1, conforme Bauer et al. (1991) e o conjunto de *primers* B-ACT F e B-ACT R, para a amplificação de um fragmento de 88 pb do gene da β -actina humana, como controle de qualidade das amostras

extraídas (Sesarini et al., 2009). Cada reação de PCR foi preparada contendo um volume final de 25 μ L e submetidas a um termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial à 94°C por 10 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, encerrados com uma extensão à 72°C por 5 min. A visualização dos resultados se deu em gel de agarose 0,8%.

Para a comparação entre os resultados obtidos com a PCR e os resultados dos exames citológico foi utilizado o teste qui-quadrado de McNemar para duas amostras relacionadas, para um nível de significância de 0,1%. Para estas análises foi utilizado o software estatístico BioEstat 5.3.

Resultados e Discussão

Todas as 496 amostras biológicas amplificaram para o gene da β -actina humana, atestando a qualidade do DNA extraído a partir do material cérvico-uterino coletado. A positividade de 100% das amostras biológicas foi confirmada por visualização em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio em transluminador de luz UV.

Em relação   detecção de DNA viral do HPV nas 496 mulheres participantes, 12,7% (63/496) dos casos mostraram-se positivos. Nestes casos foi observada a amplificação do fragmento do DNA viral a partir dos *primers* consenso MY09 e MY11. O restante da amostra, 87,3% (433/496), não apresentaram amplificação quando visualizadas em gel de agarose.

A tabela 1 apresenta a comparação entre os resultados obtidos utilizando a PCR como ferramenta de diagnóstico da presenç  de HPV na amostra e os exames citológicos para detecção de alterações celulares causadas pelo mesmo, os quais são interpretados como positivos para a presenç  de HPV. Comparando os resultados dos exames citológicos com os da PCR, observou-se que o primeiro apresentou 2,4% (12/496) de resultados positivos, enquanto que a PCR apresentou 12,7% (63/496), como mencionado anteriormente. Estes resultados

apresentaram uma diferença significativa ($\chi^2 = 42,37$), com um $P < 0,0001$, sendo assim a PCR um método mais sensível que o exame citológico.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtido com a PCR e os exames citológicos das pacientes assintomáticas para presença do HPV

Resultados da PCR	Resultados do exame citológicos		Total
	HPV positivo	HPV negativo	
HPV positivo	8	55	63
HPV negativo	4	429	433
Total	12	484	496

A tabela 2 apresenta quais lesões foram visualizadas pelo exame citológico nas 12 (2,4%) amostras consideradas positivas para este método de análise. Destas amostras, 10 (83,3%) foram classificadas com presença de células escamosas atípicas de significado

indeterminado (ASCUS) e duas com outros tipos de lesões, sendo uma classificada como células escamosas atípicas que não permitem excluir uma lesão de alto grau (ASC-H) (8,3%) e a outra como lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) (8,3%).

Tabela 2. Descrição do tipo de lesão encontrado no exame citológico comparado aos resultados do PCR

Resultados da PCR	Resultados do exame citológicos			Total
	ASCUS	LSIL	ASC-H	
HPV positivo	8	0	0	8
HPV negativo	2	1	1	4
Total	10	1	1	12

O uso de marcadores moleculares no estudo de populações, tanto na caracterização estrutural como em diagnósticos (Sesarini et al., 2009; Torres et al., 2012), vem ganhando cada vez mais espaço. Isto se dá pela rapidez dos resultados e a sensibilidade e confiabilidade dos métodos utilizados, muitas vezes não invasivos (Barea et al., 2004). Com isso, o presente estudo visou determinar a prevalência da infecção por HPV em mulheres assintomáticas através da Reação em Cadeia da Polimerase.

Os resultados do presente estudo demonstram que o uso de marcador molecular para detectar a presença do DNA do HPV, e consequentemente a sua presença, em amostras de material cérvico-uterino, se mostrou mais sensível que exames citológicos realizados nas mesmas amostras (Tabela 1). Os resultados mostraram que o DNA viral estava presente em 12,7% da amostra, enquanto que resultados positivos através de exames citológicos foi de 2,4% das amostras testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Pinto et al. (2011) em populações da Amazônia, nas quais os

autores encontraram uma prevalência de 14,6% para análises moleculares e 2,8% para exames citológicos. Este padrão também foi observado por Freitas et al. (2007), porém a diferença entre os valores para o diagnóstico molecular e citológico, 39,6% e 20,6%, respectivamente, não foram tão expressivos.

Com relação à detecção do DNA do HPV em mulheres assintomáticas amostradas no presente estudo (12,7%), este ficou muito próximo a resultados encontrados por outros autores, os quais variaram entre 10,6% a 17% em diferentes populações, utilizando o mesmo par de *primers* (Eluf-Neto et al., 1994; Chaiwongkot et al., 2007; Trottier et al., 2008; Duarte et al., 2010; Pinto et al., 2011). Também foram observadas prevalências maiores, 33,9% e 39,6%, dados obtidos por Remmerbach et al. (2004) e Freitas et al. (2007), respectivamente.

O método molecular com PCR mostrou-se mais sensível como já relatado. Porém, algumas amostras consideradas positivas pelo exame citológico não apresentaram amplificação do DNA viral. Dentre as 12 amostras com alteração

citológica, o DNA de HPV foi detectado em oito (66,6%). Resultados semelhantes foram encontrados por Bringhenti et al. (2010) e Noronha et al. (1999), respectivamente 64% e 63%. A não amplificação do genoma viral nas demais amostras pode ser explicada pela falta de especificidade por parte dos *primers* MY09/11 para certos tipos de HPV, conforme já descrito por Gravitt et al. (2000). Outra possível explicação para a não amplificação, segundo Walboomers et al. (1997), é a perda da região L1 (local de anelamento dos iniciadores) durante a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro.

Conclusão

A prevalência de infecção pelo HPV na amostra foi de 12%, isto é, 63 amostras num total de 496. A confirmação se deu a partir da detecção de fragmento de DNA viral no produto de PCR.

Comparando os resultados dos exames citológicos com os da PCR, observou-se que o primeiro apresentou 2,4% (12/496) de resultados positivos, enquanto que a PCR, 12,7% (63/496), como mencionado anteriormente.

A diferença observada entre o método molecular e citológico se mostrou significativa ($\chi^2 = 42,37$), com um $P < 0,0001$, sendo assim a PCR um método mais sensível que o exame citológico.

Agradecimentos

A realização desta pesquisa se deve ao apoio da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À Rede Feminina Regional de Combate ao Câncer (São Miguel do Oeste) pela grande colaboração na obtenção das amostras.

Referências

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSCHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 26(4): 274-281, 2004.

BAUER, H. M.; TING, Y. M. S.; GREER, C. E.; CHAMBERS, J. C.; TASHIRO, C. J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M. M. Genital Human Papillomavirus Infection in Female University Students as Determined by a PCR-Based Method. **Journal of the American Medical Association** 265(4): 472-477, 1991.

BERKHOF, J.; COUPÉ, V. M.; BOGAARDS, J. A.; KEMENADE, F. J. V.; HELMERHORST, T. J.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. The health and economic effects of HPV DNA screening in the Netherlands. **International Journal of Cancer** 127(9): 2147-2158, 2010.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology** 55: 244-265, 2002.

BRINGHENTI, M. E. Z.; DOZZA, T. G.; DOZZA, T. G.; MARTINS, T. R.; BAZZO, M. L. 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** 22(3): 135-140, 2010.

BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; FERRER, E.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. **Journal of Infectious Diseases** 202(12): 1789-1799, 2010.

CARESTIATO, F. N.; SILVA, K. C.; DIMETZ, T.; OLIVEIRA, L. H. S.; CAVALCANTI, S. M. B. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Genital Tract Determined by Hybrid Capture Assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** 10(5): 331-336, 2006.

CHAIWONGKOT, A.; PIENYONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; KONGYINGYONES, B.; THINKHAMROP, J.; YUENYAO, P.; SRIAMPORN, S. Evaluation of Primers and PCR Performance on HPV DNA Screening in Normal and Low Grade Abnormal Cervical Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** 8(2): 279-282, 2007.

DUARTE, D. V.; BRITO, E. B.; CANTO, A. S. S.; ISHIKAWA, E. A. Y.; PINHEIRO, J. G.; COSTA, J. H. G.; SOUSA, M. S. Frequência e genotipagem do Papilomavírus humano em mulheres de comunidades ribeirinhas do Município de Abaetetuba, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 1(3): 75-82, 2010.

ELUF-NETO, J.; BOOTH, M.; MUFNOZ, N.; BOSCH, F. X.; MEIJER, C. J. L. M.; WALBOOMERS, J. M. M. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer** 69: 14-119, 1994.

FARIA, I. M.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F.; FARIA, F. M.; CARVALHO, N. O.; ARAÚJO, A. C. L.; OLIVEIRA, H. C. Acuidade da citologia oncológica para o diagnóstico da infecção pelo HPV no colo uterino de mulheres portadoras do HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** 30(90): 437-444, 2008.

FLORES, Y. N.; BISHAI, D. M.; SHAH, K. V.; PONCE, E. L.; LÖRINCZ, A.; HERNÁNDEZ, M.; FERRIS, D.; SALMERÓN, J. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. **Salud Pública de México** 50(1): 49-58, 2008.

FREITAS, T. P.; CARMO, B. B.; PAULA, F. D. F.; RODRIGUES, L. F.; FERNANDES, A. P.; FERNANDES, P. A. Molecular detection of hpv 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo** 49(5): 297-301, 2007.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUPLÉE, F.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology** 38(1): 357-361, 2000.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, W.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** 61: 69-90, 2011.

LEE, J. K.; HONG, Y. J.; UM, T. H.; LEE, E. H.; CHI, H. S.; KOH, J. S.; YIM, H. W.; CHA, Y. J.

Detection and identification of human papillomavirus using a PCR-restriction fragment mass polymorphism assay. **Molecular Medicine Reports** 4(4): 645-650, 2011.

MARTINS, L. F. L.; VALENTE, J. G.; THULER, L. C. S. Factors related to inadequate cervical cancer screening in two Brazilian state capitals. **Revista de Saúde Pública** 43(2): 318-325, 2009.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine** 348(6): 518-527, 2003.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L.; BRITO, A.; MACÊDO, R.; BISI, F.; MOTA, R.; SASSAMOTO, K.; MONTEIRO, T.; LINHARES, A. Papilomavírus humano associado a lesões de cérvix uterina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 32(3): 235-240, 1999.

PINTO, D. S.; FUZII, H. T.; QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. **Cadernos de Saúde Pública** 27(4): 769-778, 2011.

RAMA, C. H.; MARTINS, C. M. R.; DERCHAIN, S. F. M.; FILHO, A. L.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública** 42(1): 123-130, 2008.

REMMERBACH, T. W.; BRINCKMANN, U. G.; HEMPRICH, A.; CHEKOL, M.; KÜHNDEL, K.; LIEBERT, U. G. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. **Journal of Clinical Virology** 30(4): 302-308, 2004.

SANTANA, E. A.; BISELLI, P. M.; BISELLI, J. M.; ALMEIDA, M. T. G.; BERTELLI, E. C. P. Câncer cervical: etiologia, diagnóstico e prevenção. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde** 15(4): 199-204, 2008.

- SEARINI, C.; GIMÉNEZ, M. L.; REDAL, M. A.; IZBIZKY, G.; AIELLO, H.; ARGIBAY, P.; OTAÑO, L. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. **Archivos Argentinos de Pediatría** 107(5): 405-409, 2009.
- SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B.; KEYS, J.; FRANCESCHI, S.; WINER, R.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **International Journal of Cancer** 121(3): 621-632, 2007.
- SMITH, J. S.; MELENDY, A.; RANA, R. K.; PIMENTA, J. M. Age-Specific Prevalence of Infection with Human Papillomavirus in Females: A Global Review. **Journal of Adolescent Health** 43(4): S5.e1-S5.e62, 2008.
- SOLOMON, D.; DAVEY, D.; KURMAN, R.; MORIARTY, A.; O'CONNOR, D.; PREY, M.; RAAB, S.; SHERMAN, M.; WILBUR, D.; WRIGHT Jr., T.; YOUNG, N. The 2001 Bethesda System: Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. **Journal of the American Medical Association** 287(16): 2114-2119, 2002.
- TORRES, B.; STOFFEL, T. J.; Oro, D.; ROSSI, E. M.; MIRANDA, G. B.; HOUENOU, L. J.; TROTT, A. Early non-invasive fetal RHD genotyping and sex determination by conventional and multiplex PCR performing a rapid and lowcost cell-free fetal DNA extraction method. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 165: 370, 2012.
- TROTTIER, H.; SALAHEDDIN, M.; PRADO, J. C. M.; SOBRINHO, J. S.; COSTA, M. C.; ROHAN, T. E.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination. **Journal of Infectious Diseases** 197: 1436-1447, 2008.
- WALBOOMERS, J. M. M.; MEIJER, C. J. L. M. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? **Journal of Pathology** 181(3): 253-254, 1997.
- WEBER, G. R.; DISNER, G. R.; NICOLAU, L. S.; GIOVANAZ, G.; TROTT, A.; MIRANDA, G. B. Use of saline solution (NaCl) in the DNA extraction from hair bulbs. **Evidência** 10(1-2): 115-120, 2010.