

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIANA PENHA DE NADAI SARTORI

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MENINAS DE UMA
UNIDADE DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE VITÓRIA:
AVALIAÇÃO DE UM POTENCIAL GRUPO DE RISCO.**

VITÓRIA

2012

MARIANA PENHA DE NADAI SARTORI

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MENINAS DE UMA
UNIDADE DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE VITÓRIA:
AVALIAÇÃO DE UM POTENCIAL GRUPO DE RISCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Chambô Filho

VITÓRIA

2012

MARIANA PENHA DE NADAI SARTORI

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM MENINAS DE UMA
UNIDADE DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE VITÓRIA:
AVALIAÇÃO DE UM POTENCIAL GRUPO DE RISCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 09 de Março de 2012.

Prof. Dr. Lúri Drumond Louro
Instituição: UFES
Orientador

Prof. Dr. Antônio Chambô Filho
Instituição: EMESCAM

Profa. Dra. Flavia Imbroisi Valle Errera
Instituição: EMESCAM

Prof. Dr. Ricardo Cristiano Leal da Rocha
Instituição: EMESCAM

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

	Sartori, Mariana Penha De Nadai, 1985-
S251p	O papilomavírus humano em meninas de uma unidade de saúde do município de Vitória : avaliação de um potencial grupo de risco / Mariana Penha De Nadai Sartori. – 2012. 91 f. : il.
	Orientador: Iúri Drumond Louro. Coorientador: Antônio Chambô Filho.
	Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.
	1. Papillomavírus humano. 2. Meninas. 3. Papillomavírus humano – Transmissão. 4. Papillomavírus humano – Prevenção. 5. Detecção do HPV. 6. Genotipagem do HPV. I. Louro, Iúri Drumond. II. Chambô Filho, Antônio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.
	CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Lúri Drumond Louro, pelo incentivo para desenvolver o mestrado e por acreditar no meu trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e compreensão; e principalmente pela orientação desde a iniciação científica.

Ao prof. Dr. Antônio Chambô Filho, pela confiança e por ter me dado o privilégio de ser co-orientada pelo senhor. Agradeço por este projeto, pelo desafio de desenvolvê-lo, por estar sempre disponível a me ajudar e pela oportunidade de ouvir seus ensinamentos; foram fundamentais para a realização do mestrado.

À prof. Dra. Flávia Imbroisi Valle Errera por aceitar participar da banca examinadora.

Ao prof. Dr. Ricardo Cristiano Leal da Rocha por aceitar participar da banca examinadora e pelo auxílio nas coletas.

Aos funcionários do ambulatório de ginecologia Infante Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória, pelo auxílio e por serem sempre solícitos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

À Eldamária de Vargas Wolfgramm e a Thaís Tristão Tovar, por serem companheiras de laboratório e grandes amigas. Muito obrigada pelas sugestões, idéias e por me ajudarem a desenvolver este projeto, sem vocês não teria conseguido finalizar o mestrado. A amizade e o profissionalismo de vocês são exemplares e admiráveis.

Aos demais amigos do NGHM, principalmente aqueles presentes desde a iniciação científica, obrigada pela companhia e pelos momentos de descontração. Seria impossível trabalhar sem a colaboração, amizade e a alegria de vocês.

Ao Irineu Iester Degasperi, pelas idéias, ajudas, confiança e compreensão.

Aos meus pais, irmã, cunhado, noivo e amigas; por serem meu porto seguro, por me darem forças nos momentos mais difíceis e pelos momentos de descontração.

E principalmente a Deus, pelas bênçãos e por conseguir alcançar mais esta vitória; sem Ele, nada seria possível.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é considerado a doença sexualmente transmissível prevalente mundialmente, sendo responsável por causar verrugas genitais (HPV de baixo risco) e o câncer de colo de útero (HPV de alto risco). O vírus é encontrado em adultos e adolescentes sexualmente ativos, entretanto, tem sido também detectado em meninas vítimas de violência sexual ou não. Em todo o mundo, a incidência do HPV vem aumentando em meninas e as formas de transmissão viral ainda não são totalmente conhecidas. Atualmente, a prevenção do HPV é baseada em dois tipos de vacinas, disponíveis somente para um grupo de indivíduos na idade entre 9 – 26 anos, não estando disponível nenhuma vacina ou outra forma de prevenção para pacientes abaixo de nove anos, uma vez que este grupo não é considerado um grupo de risco pelos órgãos de saúde pública. Não há estudos no estado do Espírito Santo relacionando a prevalência do HPV em meninas abaixo de nove anos de idade, portanto, a sua importância não é conhecida. Devido a estas razões, o objetivo da pesquisa foi detectar o HPV em meninas na faixa etária até nove anos, bem como determinar as possíveis vias de transmissão viral com o intuito de fornecer informações para o desenvolvimento de atitudes preventivas para esse grupo de risco. O DNA viral foi extraído de um total de 43 amostras de meninas na faixa etária estabelecida, e a análise molecular foi realizada através dos métodos de PCR, RFLP e sequenciamento para detecção e genotipagem viral. O papilomavírus humano foi detectado em 13,9% das pacientes, com prevalência dos genótipos virais de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias. A avaliação clínica e epidemiológica propõe que as meninas são infectadas por transmissão horizontal e via fômites. De acordo com nossos resultados, propomos que a prevenção da infecção do HPV através da vacinação deve compreender meninas com idade abaixo de 9 anos, especialmente nas populações de alto risco.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano. Meninas. Detecção Viral. Genotipagem do HPV. Transmissão. Prevenção.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus in the world, being a cause of genital warts (Low-Risk HPV) and cervical cancer (High-Risk HPV). The virus is found in sexually active adults and adolescents, however, it has been detected in girls victims of sexual violence or not. The worldwide incidence of HPV is increasing in girls and viral transmission modes are still not completely defined. Currently, HPV prevention is based on two available vaccines only for the age group 9-26 years old and there are no available vaccines or other prevention methods for patients under nine years old, since it is not considered a risk group by competent health authorities. There are no studies of the Espírito Santo state about the HPV prevalence in girls under 9 years old and therefore their importance is not established. Because of these reasons, the aim of this study was to detect HPV in girls under nine years old, as well as finding possible routes of transmission in order to provide information for the development of preventive practices for this risk group. A total of 43 samples extracted from girls under 9 years old were analyzed using PCR, RFLP and DNA sequencing methods for viral detection and typing. Human papillomavirus was detected in 13.9% of patients, mostly low risk genotypes. Clinical and personal evaluation suggested that girls were infected by horizontal transmission and via fomites. Due to our findings, we propose that HPV infection prevention through vaccination should be extended to girls under 9 years old, especially in specific high risk populations.

Key words: Human Papillomavirus. Girls. Viral Detection. HPV Genotyping. Transmission. Prevention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV	19
Figura 2 - Mecanismos molecular pelo qual as oncoproteínas do HPV cooperam para induzir a carcinogênese cervical	22
Figura 3 - Ciclo de vida do papilomavírus humano	24
Figura 4 - Prevalência do HPV de acordo com a idade.....	26
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do <i>primer</i> MY09/MY11.....	56
Figura 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do <i>primer</i> GP05/GP06.....	56
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto da digestão com as enzimas Dde I e Rsa I.....	58
Figura 8 - Sequenciamento de duas amostras HPV positivas pelo iniciador GP05/GP06.....	60
Figura 9 - Frequência dos genótipos do Papilomavírus Humano identificados nas amostras HPV positivas.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores usados para a amplificação do HPV.....	43
Tabela 2 - Programa de amplificação usado na PCR.....	43
Tabela 3 - Componentes ideais de cada enzima.....	46
Tabela 4 - Padrão RFLP do fragmento de DNA de vários tipos de HPV.....	48
Tabela 5 – Características epidemiológicas da população estudada.....	54
Tabela 6 - Genótipos virais e padrões de corte identificados nas pacientes HPV positivas através do método de RFLP.....	59
Tabela 7 – Análise da pacientes HPV positivas do estudo	62

LISTA DE SIGLAS

5 - FU	5 –Fluoracil
A	Adenina
APS	Persulfato de Amônio
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
CAF	Alça Cirúrgica de Alta Frequência
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
E	Precoces (do inglês Early)
ES	Espírito Santo
EtOH	Etanol
FDA	US Food and Drug Administration
G	Guanina
GSK	Glaxo Smith Kline
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano (do inglês Human Papillomavirus)
HR	High Risk (alto risco)
L	Tardios (do inglês Late)

LCR	Longa Região de Controle
LoTE	Low Tris-EDTA
LR	Baixo Risco (do ingles Low Risk)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGHM	Núcleo de Genética Humana e Molecular
NIC	Neoplasia Intra-Epitelial Cervical
NH ₄ Ac	Acetato de Amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PC9	Phenol Chloroform pH 9
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
RB1	Proteína do Retinoblastoma 1
RFLP	Polimorfismo de Fragmentos de DNA (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism)
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina

TBE	Tris Borato EDTA
TE9	Tris EDTA pH9
TEMED	N', N', N', N' - Tetrametiletilenodiamina
TP53	Proteína tumoral 53
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VLPs	Partículas como vírus (do inglês Virus Like Particles)

LISTA DE SÍMBOLOS

≈	aproximadamente
g	grama
°C	grau Celsius
h	hora
kDA	kilodalton
®	marca registrada
µg	micrograma
µl	microlitros
µm	micrômetro
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
ng	nanograma
pb	pares de bases
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
U	unidade
X	vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	A Prevalência do Papilomavírus Humano.....	17
1.2	Biologia do HPV	18
1.2.1	<i>Transformação Celular.....</i>	<i>20</i>
1.2.2	<i>Classificações e Tipos de Infecções pelo HPV</i>	<i>22</i>
1.2.3	<i>Ciclo de Replicação do Vírus</i>	<i>23</i>
1.3	Epidemiologia.....	25
1.4	A Infecção pelo HPV em crianças.....	27
1.5	Vias de Transmissão Viral.....	28
1.6	Métodos de Detecção do Papilomavírus Humano	30
1.7	Prevenção e Tratamento do HPV	32
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	METODOLOGIA	37
3.1	Descrição do Estudo.....	38
3.1.1	<i>Considerações Éticas.....</i>	<i>38</i>
3.2	Amostras Estudadas.....	38
3.2.1	<i>Avaliação Epidemiológica.....</i>	<i>39</i>
3.2.2	<i>Coleta das Amostras</i>	<i>40</i>
3.3	Extração do DNA.....	40
3.4	Detecção do DNA Viral	41
3.4.1	<i>Reação em Cadeia da Polimerase.....</i>	<i>42</i>
3.4.2	<i>Eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida</i>	<i>43</i>
3.4.3	<i>Método de Impregnação pela Prata</i>	<i>44</i>
3.4.4	<i>Interpretação dos Resultados Obtidos pelo Método de PCR</i>	<i>44</i>
3.5	Determinação do Tipo Viral.....	45
3.5.1	<i>Digestão dos Produtos Amplificados pelo Método de RFLP</i>	<i>46</i>
3.5.1.1	<i>Eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida</i>	<i>46</i>
3.5.1.2	<i>Método de Impregnação pela Prata</i>	<i>47</i>

3.5.1.3	<i>Interpretação dos Resultados Obtidos pelo Método de RFLP.....</i>	<i>47</i>
3.5.2	<i>Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados pela PCR.....</i>	<i>50</i>
3.5.2.1	<i>Purificação dos Produtos da PCR.....</i>	<i>51</i>
3.5.2.2	<i>Preparação das Amostras a Serem Sequenciadas.....</i>	<i>51</i>
3.5.2.3	<i>Análise dos Resultados do Sequenciamento.....</i>	<i>51</i>
3.6	Análise Estatística.....	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Características das Amostras e Estudo Epidemiológico.....	54
4.2	Detecção do DNA Viral Através do Método da PCR.....	55
4.3	Determinação do Tipo Viral das Amostras HPV Positivas.....	57
4.3.1	<i>Resultados do Método de RFLP.....</i>	<i>57</i>
4.3.2	<i>Resultados Através do Sequenciamento.....</i>	<i>60</i>
4.3.3	<i>Análise Total dos Resultados HPV Positivos.....</i>	<i>62</i>
5	DISCUSSÃO.....	64
5.1	Correlação da Frequência do HPV com Método de Detecção Viral.....	65
5.2	Definição dos Genótipos Virais nas Amostras HPV Positivas.....	67
5.3	Avaliação dos Dados Epidemiológicos e Definição das Possíveis Vias de Transmissão Viral.....	70
5.4	Sugestões de Tratamentos e Futuras Formas de Prevenção para este Grupo de Risco.....	74
5.5	Considerações Finais.....	74
6	CONCLUSÃO.....	76
7	REFERÊNCIAS.....	78
	ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 A PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O papilomavírus humano (HPV) é a infecção viral mais comum transmitida sexualmente entre adultos e adolescentes, caracterizado como causador de verrugas genitais e como o principal responsável pelo desenvolvimento do câncer do colo do útero. Estima-se que 75% da população sexualmente ativa entre em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida (Koutsky, 1997).

A prevalência da infecção pelo HPV apresenta heterogeneidade significativa em sua distribuição geográfica. Considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer do colo uterino (Pinotti & Ricci, 2005), tornou-se um importante e gravíssimo problema de saúde pública, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

O International Biological Study on Cervical Cancer demonstrou em 1995 uma análise estatística realizada em 22 países, onde registraram que o HPV esteve associado com o câncer do colo do útero em 75 a 100% dos casos, com média de 92,9% (Bosch et al., 1995). Globalmente, o papilomavírus humano é responsável por aproximadamente 500.000 casos de câncer cervical a cada ano e 10 milhões de novos casos de neoplasias cervicais intra-epiteliais de alto grau (Ferlay et al., 2004). É estimado que 30 milhões de mulheres e homens adquiram verrugas anogenitais (condiloma acuminado) ou baixo grau de neoplasia cervical intra-epitelial a cada ano (World Health Organization, 2004).

Dados atuais apontam uma alta prevalência proporcional do vírus sendo observada na África Sub-Saariana (Clifford et al., 2005). Na Itália a prevalência da infecção anogenital por HPV é na faixa de 8,8% a 15,9% (Centurioni et al., 2005). No EUA, 20 milhões de pessoas são afetadas pelo HPV e a cada ano estima que 6,2 milhões de novos casos sejam apontados; desses, aproximadamente 75% são indivíduos entre 15 a 50 anos de idade, sendo que 60% deles apresentam a infecção transitória, 10% com a infecção persistente, 4% com leves sinais citológicos e 1% apresentam lesões clínicas (World Health Organization, 2007).

No Brasil os dados estatísticos da prevalência do HPV estão relacionados às análises de pacientes portadoras de neoplasias cervicais intra-epiteliais e carcinoma invasivo do colo do útero, e demonstram que entre 1979 e 2000 houve um aumento de 33,1% na mortalidade por câncer de colo uterino (Instituto Nacional do Câncer, 2010). Em 2003, novos casos foram estimados com 4.110 óbitos (Josefsson et al., 2000)

Em estudo transversal com mulheres atendidas em um serviço público de rastreamento para câncer em Porto Alegre (RS) detectou-se o material genético do HPV em 27% das amostras (Nonnenmacher et al., 2002).

Na população rural do Nordeste brasileiro, a prevalência do HPV foi de 26% (De Lima Soares et al., 2003).

Em amostra de mulheres de uma instituição carcerária de São Paulo, a detecção do papilomavírus humano foi de 16,3% para os HPV de alto risco e de 4,8% para os HPV de baixo risco (Lopes et al., 2001). Oliveira et al. (2006) identificaram positividade para o vírus em 58% das mulheres encaminhadas para exame de rotina em serviço privado do Rio de Janeiro, RJ.

Em pesquisa realizada em Vitória (ES), alterações celulares sugestivas do papilomavírus humano foram encontradas em 10% de 299 mulheres na idade entre 15 a 49 anos atendidas em uma unidade básica de saúde (Barcelos, 2005). Ainda, em outro trabalho realizado com 248 capixabas, sendo 112 soropositivas e 172 soronegativas para o HIV, o HPV foi identificado em 46,8% das pacientes, estando positivo em 56,2% e 40,7% do total das soropositivas e soronegativas para o HIV, respectivamente (Lima et al., 2009).

A literatura ainda carece de dados estatísticos referente à frequência do papilomavírus humano no restante da população e no restante dos estados brasileiros.

1.2 BIOLOGIA DO HPV

O Papilomavírus Humano pertencente à família *Papovaviridae*, são pequenos vírus, não envelopados, com forma icosaédrica e apresentam diâmetro de 52 a 55nm. O genoma do HPV é composto por um DNA circular dupla fita de aproximadamente 8000 pares de bases envolto por um capsídeo icosaédrico de 72 capsômeros (Rapaport., 2005).

O genoma viral está organizado em três segmentos universais de desigual tamanho. Aproximadamente 10% do genoma está contido dentro da longa região de controle (LCR) e funciona na regulação da expressão do gene viral. O restante do genoma está organizado dentro dos genes precoces (E - *early*) e tardios (L - *late*), codificando 50% e 40% de todo o gene, respectivamente (Hausen et al., 1994 e Pfister & Fuchs, 1994) (figura 1).

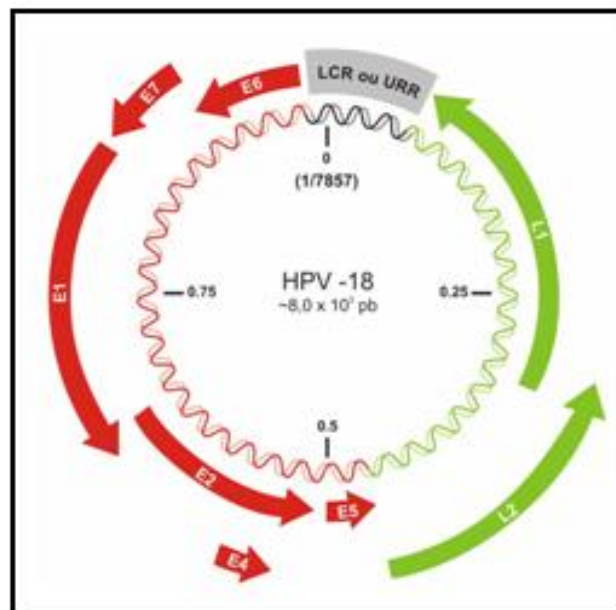


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV (modificado de SILVA; AMARAL; CRUZ, 2002).

Todos os genes virais são codificados por uma fita do DNA. Os genes L1 e L2 codificam o capsídeo maior (70kDA) e o capsídeo menor (55kDA) os quais são os únicos expressos terminalmente diferenciados em células epiteliais escamosas (Favre et al., 1975; Garlick & Taichman, 1991).

Os genes precoces são divididos em E1, E2, E4, E5, E6 e E7: todos codificam proteínas não estruturais as quais estão correlacionadas com a regulação da transcrição e replicação viral. Os genes E1 do HPV são responsáveis por se ligarem a sequências específicas dentro da região LCR para iniciar a replicação do DNA (Clertant & Seif, 1984). Pela ação de ativadores ou repressores transcricionais, a proteína do gene E2 está relacionada à regulação da transcrição viral e replicação genômica (Spalholz et al., 1985 e Lambert et al., 1987). A *open reading frame* E4 é expressa tardiamente na replicação viral e está envolvida na manutenção e na liberação de partículas do papilomavírus (Doorbar et al., 1991 e Roberts et al., 1993). A função do gene E5 ainda não é muito bem estabelecida, porém estudos atuais sugerem um papel de apoio na progressão tumoral (Roberts et al., 1993). Por fim, as proteínas E6 e E7 atuam na modulação da atividade de proteínas celulares que regulam o ciclo celular, anulando o *check point* desses ciclos celulares pela inativação de genes supressores tumorais, como *TP53* e *RB1*, os quais são alvos das proteínas celulares hospedeiras envolvidos na apoptose e transformação celular maligna; resultando em atributos oncogênicos (Werness et al., 1990 e Boulernouar et al., 2010).

1.2.1 Transformação Celular

Proteínas do HPV rompem ou apoderam-se de múltiplos passos de sinalizações celulares. Uma consequência disso, entretanto, é o acúmulo de mutações em genes celulares e o aumento da instabilidade genômica, os quais resultam em completa transformação. Os primeiros fatores virais responsáveis por alterarem esses passos e mediar a progressão a malignidade são as proteínas E5, E6 e E7; porém

recentes estudos têm sugerido que ainda um importante passo na carcinogênese do HPV pode estar relacionado à inserção do DNA viral no genoma do hospedeiro (Moody & Laimins, 2010)

A entrada desse genoma viral se dá através da linearização do DNA circular do vírus com posterior inserção no cromossomo do hospedeiro; mecanismo este, que faz com que o genoma viral perca o gene E2, o qual resulta na superexpressão dos genes virais, com um aumento considerável da expressão das oncoproteínas E6 e E7. (Silva et al., 2002; Schmidt et al., 2005)

A combinação de E6 e E7, entretanto, é eficiente na imortalização de muitos tipos de células primárias(Hawler-Nelson et al., 1989). Os produtos dos genes supressores de tumores presentes nas células como as proteínas pRb e p53 são alvo da ação dos produtos dos genes dos HPVs (Silva et al., 2002).

A proteína pRb tem a função de inibir a progressão do ciclo celular, pois é capaz de sequestrar o fator de transcrição E2F e impedi-lo de promover a transcrição de genes necessários para a replicação do DNA na fase S. A associação da proteínas pRb com a proteína viral E7 rompem o complexo Rb-E2F, promovendo a entrada prematura na fase S e na síntese de DNA , conseqüentemente causando uma perturbação no controle normal do ciclo celular (Sandal, 2002; Silva et al.).

Já a proteína p53 tem a função de reprimir o crescimento e sinalizar para a morte celular (apoptose). A ativação dessa proteína após algum estresse celular é capaz de mobilizar uma defesa na qual a própria p53 age ativando outros genes com o objetivo de monitorar danos ocorridos nas moléculas de DNA impedido que o ciclo celular prossiga até que o dano seja restaurado (Lewin, 2000). Porém a ligação da proteína E6 a p53 resulta em uma rápida degradação, com conseqüente perda da capacidade celular em perceber e reparar possíveis erros ao DNA (Stubenrauch & Laimins, 1999). O acúmulo de eventos mutacionais é a causa subjacente ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico, assim, provavelmente, resultam no câncer (Vousden, 1993; Griffith et al., 1998; Vogel & Motulsky, 2000).

Embora E6 e E7 forneçam atividades de transformação primária de HPV de alto risco, E5 pode aumentar o funcionamento e contribuir com essas proteínas para a progressão tumoral. Em cultura de tecido, HPV E5 pode aumentar a atividade

transformadora de E6 e E7, resultando na progressão tumoral (Moody et al., 2010) (figura 2).

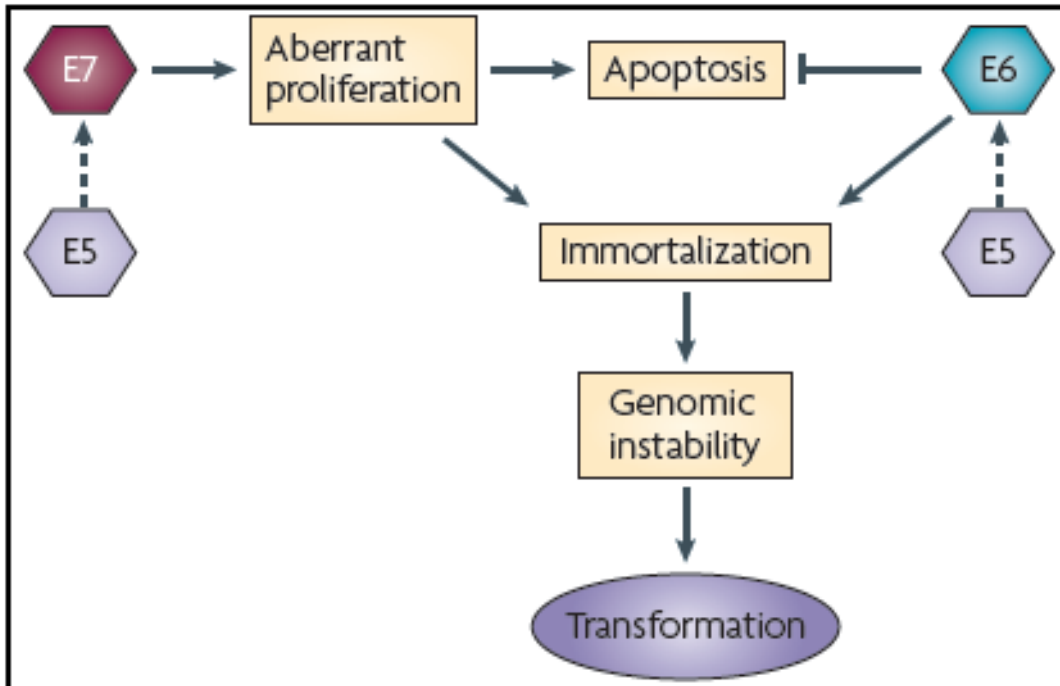


Figura 2. Mecanismos molecular pelo qual as oncoproteínas do HPV cooperam para induzir a carcinogênese cervical (modificado de Moody & Laimins, 2010)

Portanto, é possível que existam múltiplos passos para o HPV induzir a tumorigênese e promover a progressão tumoral; sendo este um modelo excepcional para a compreensão do desenvolvimento de muitos outros cânceres humanos, além de permitir a identificação de adicionais vias de sinalizações alvos na progressão maligna.

1.2.2 Classificações e Tipos de Infecções pelo HPV

Os papilomavírus são divididos em tipos, que diferem entre si em pelo menos 10% da sequência gênica da proteína maior do capsídeo viral, L1. Os subtipos virais são aqueles em que há diferença entre 2 a 10% da sequência gênica de um tipo viral conhecido, sendo esses muito raros (Bernard et al., 2006). De acordo com estudos atuais, mais de 120 diferentes genótipos de HPV tem sido identificado como potenciais causadores de infecções na mucosa e nas células epiteliais humanas, destes, 40 estão associados com o trato genital (Bernard et al., 2010).

Existe especificidade quanto ao tropismo tecidual dentre os HPVs, que podem infectar a epiderme (cutaneotrópicos) e aqueles que infectam as mucosas em geral (mucosotrópicos) (Tjiong et al., 2001). De acordo com sua associação para o desenvolvimento de neoplasias, são classificados em duas categorias: baixo (*Low Risk*, LR-HPV) ou alto risco (*High Risk*, HR-HPV) oncogênico (Cason & Mant, 2005). As infecções dos tipos de baixo risco incluem 6, 11, 13, 32, 40, 42, 44, 53, 54, 55 e 63; os quais estão normalmente associados com alterações benignas como as lesões condilomatosas e em parte das lesões intra-epiteliais cervicais de baixo grau. O alto risco dos tipos oncogênicos inclui HPV 16, 18, 31, 33 e 35; sendo todos associados a uma alta frequência de desenvolvimento de lesões malignas como neoplasia cervical (Zur Hausen, 1977; De Villiers, 1989; Snijders et al., 1994) . HPVs de alto risco estão também associados com carcinomas penianos, vulvares, anais e contribuem com cânceres orais, em especial orofaringe (Lothaire et al., 2006; Bosch et al., 2006).

A co-infecção com múltiplos tipos de HPV e infecções de sequências com novos tipos de HPV são comuns, e o risco de aquisição de novo tipo de HPV parece ser independente da infecção primária com outros tipos (Burchell et al., 2006). Segundo estudo realizado em 2005 por Clifford et al, em mulheres com citologia normal, a infecção por apenas um tipo viral é duas a oito vezes mais comum do que a infecção múltipla.

1.2.3 Ciclo de Replicação do Vírus

Os HPVs são patógenos intra-epiteliais, cujo ciclo de replicação está intrinsecamente associado à diferenciação celular do epitélio. A infecção ocorre por meio de penetração do vírus no tecido através de micro traumas, ocorrendo à infecção inicial em células epiteliais tronco ou basais, ou ainda em células que estão transitoriamente se dividindo, localizadas nas camadas inferiores do epitélio estratificado (Silva et al., 2002).

Após entrar na célula, os genomas dos HPV são estabilizados na forma de elementos extracromossomais (epissomos) nos núcleos e o número de cópias é aumentado para aproximadamente 50 a 100 cópias por células. A expressão das proteínas virais ocorre de maneira diferenciada nas diversas camadas do epitélio, associada ao processo de maturação das células escamosas. Nas camadas superficiais, há expressão das proteínas do capsídeo e produção de novas partículas virais, as quais são eliminadas no ambiente com a descamação celular (Scheurer et al., 2005) (figura 3).

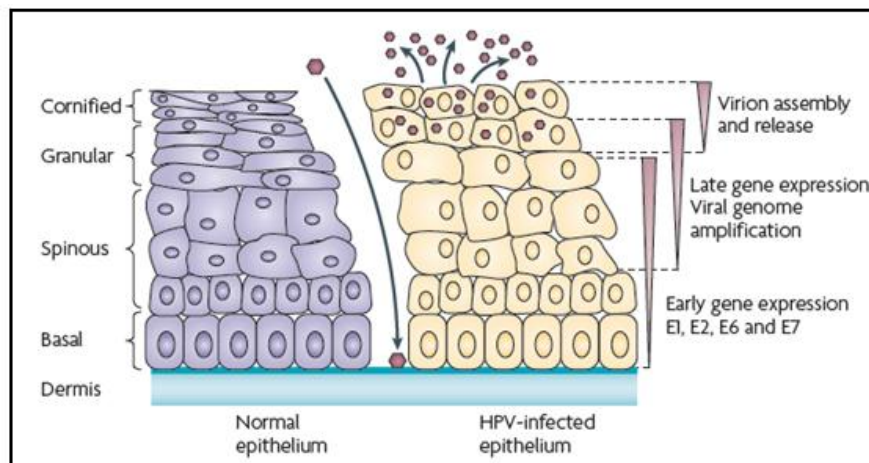


Figura 3. Ciclo de vida do papilomavírus humano (modificado de Moody et al., 2010)

Esse mecanismo de diferenciação dependente promove a infecção e manutenção persistente do HPV nas camadas basais por longos períodos.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A infecção primária pelo papilomavírus humanos frequentemente regride espontaneamente, mas se prolongada, a infecção persiste especialmente com os tipos de HPV mostrando forte associação com lesões malignas. A evolução desta infecção no indivíduo e o processo de carcinogênese dependem de uma quantidade de outros fatores relacionados ao hospedeiro.

Estudos epidemiológicos têm apontado uma variedade desses fatores como idade, menarca, coitarca, comportamento sexual, múltiplos parceiros sexuais, alta paridade, fumo, sistema imunológico, duração da infecção, tipo do genótipo do HPV, possíveis anormalidades hormonais e incidência de infecções concomitante (Szostek et al., 2009).

O DNA do HPV é detectado em aproximadamente 99.7% dos cânceres cervicais estando o HPV 16 e 18 associado com aproximadamente 60% e 10% deles, respectivamente. A infecção por HPV também esta associada com câncer no ânus, cabeça e pescoço e à recorrente papilomatose respiratória em crianças. O HPV 6 e 11 estão associados com carcinomas de células escamosas da laringe e alguns tumores da vulva, do pênis, do ânus e tão bem como aproximadamente 90% das verrugas genitais (Torre et al., 2007)

A infecção por HPV ocorre entre 1 a 2 anos do início da atividade sexual em adolescentes femininas, sendo que neste grupo a prevalência pode alcançar mais que 64%. O pico da incidência da infecção por esse vírus ocorre em mulheres entre 15 e 25 anos, sendo que alguns estudos informam um segundo pico da prevalência da infecção entre mulheres com mais de 55 anos de idade (Burchell et al., 2006) (figura 4).

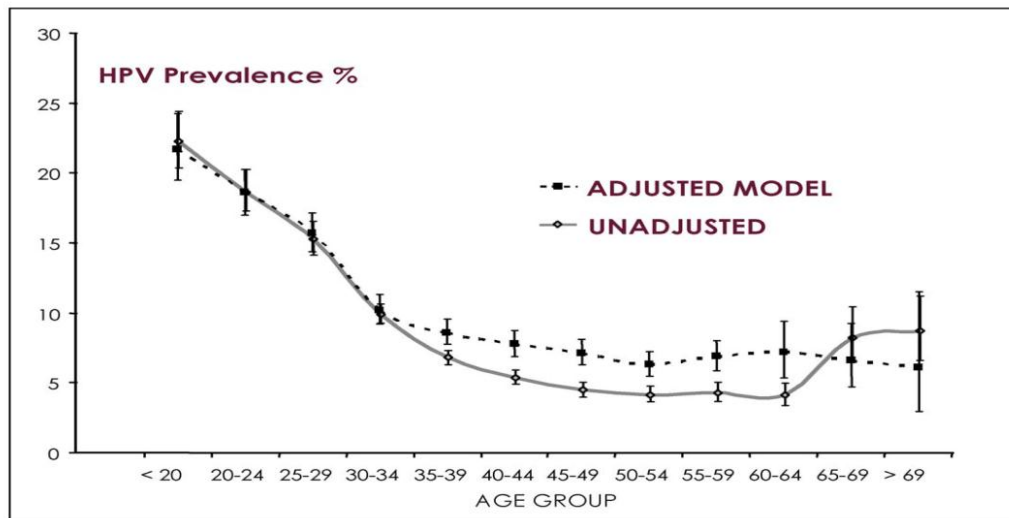


Figura 4. Prevalência do HPV de acordo com a idade (modificado de Burchell et al., 2006)

A razão para este segundo pico ainda não está estabelecida, mas de acordo com uma metanálise realizada em 2006 por Burchell et al. e Trottier & Franco, foi identificado alguns fatores que podem influenciar, como a reativação de infecções indetectáveis adquiridas anteriormente no início da vida, perda gradual de imunidade específica e aquisição de nova infecção devido ao contato sexual com novos parceiros durante a vida.

De acordo com uma revisão realizada em 2006 por Patridge et al. onde foram revisados 13 estudos sobre o papilomavírus humano, a prevalência do HPV em homens variou 3,5 a 45% relacionado a todos os tipos virais, sendo que 2,3 a 34,8% referente ao HPV de alto risco e o tipo mais comum foi o HPV 16. Em relação ao HPV de baixo risco, a variação foi entre 2,3 a 23,9%. Globalmente, os dados sugerem que a prevalência do papilomavírus em homens é mais baixa (7,9%) que em mulheres (17,95%), provavelmente devido ao epitélio peniano ser menos receptivo aos tipos de HPV de alto risco.

Em 1977, Zur Hausen relatou alta incidência da infecção viral por HPV em crianças e recém-nascidos. Um dos principais motivos é o aumento da incidência de verrugas anogenitais em adultos, o que afeta diretamente as crianças; uma vez que a mãe é considerada uma das principais responsáveis pela transmissão do vírus.

1.4 A INFECÇÃO PELO HPV EM CRIANÇAS

A descrição de verrugas genitais em crianças iniciou-se em 1980 juntamente com o aumento da frequência de abusos sexuais neste grupo; porém somente em 1990 foi possível fazer a correlação com o acentuado aumento de verrugas anogenitais. Até 1990, apenas 136 casos haviam sido relatados, mas entre 1990 e 1994 observou-se um grande aumento desse número, passando para 462 casos (Sryjanen et al., 2000). Iniciaram-se a partir de então estudos sobre a frequência do HPV de alto risco, os quais podem causar câncer, com este grupo e muitos deles sugeriram que pelo menos 45% das crianças já foram expostas a algum tipo de HPV de alto risco (Rice et al., 1999).

A infecção por HPV de alto risco parece persistir por mais tempo quando comparada as de baixo risco (Burchell et al., 2006). Em meninas, a taxa de detecção genital do DNA do HPV decresce durante o primeiro mês de vida, podendo essa regressão ser explicada através da neutralização viral pelos anticorpos adquiridos através da placenta da mãe e ainda funcionalmente ativos no neonato. Entretanto, estudos confirmam que na idade de 6 meses, 18% de amostras genitais foram positivas para o HPV de alto risco, o que coincide com o período quando o sistema imune do recém nascido está frágil e os anticorpos da circulação materna desaparecem. Estas observações sugerem que a idade de 6 meses parece ser crítica para o recém nascido adquirir a infecção por HPV (Rintala et al., 2005).

O papilomavírus humano está presente em crianças principalmente nas áreas anogenitais, no trato oral e em secreções nasofaríngeas, sendo as duas últimas diagnosticadas principalmente em recém-nascidos. Grande parte dos estudos apontam uma maior frequência dos casos de HPV em crianças do sexo feminino, sendo a manifestação em forma de verrugas anogenitais frequentemente diagnosticadas nas áreas vulvar, vaginal, uretral e perianal. Em meninos, muitas

lesões estão localizadas na área perianal, embora verrugas penianas sejam raras, ainda são descritas (Copulsky et al., 1975; Kumar et al., 1990; Oriel, 1992).

As pesquisas tem confirmado a presença do HPV em crianças, mas os modos de transmissão ainda não estão totalmente definidos. O abuso sexual tem sido considerado, em alguns casos, a principal origem das infecções genitais, porém as formas de transmissão não sexual do vírus também têm sido considerados. Estas incluem a transmissão dos pais para as crianças, a transmissão horizontal de outros membros da família em contato com a criança, a auto-inoculação de um sítio para outro, e a possível transmissão indireta por fômites.

De acordo com estudo realizado em 2000 por Syrjanen & Puranen, onde foram analisados a concordância dos tipos de HPV detectados em recém-nascidos e sua mãe, o percentual encontrado foi de apenas 57 a 69%, resultado sugestivo que as meninas adquiriram o HPV após o nascimento.

Na literatura são poucos os dados disponíveis em relação a este grupo de risco, sendo insuficientes principalmente quanto à porcentagem de meninas que são infectadas com HPV, assim como as formas de transmissão.

1.5 VIAS DE TRANSMISSÃO VIRAL

A principal maneira de transmissão do HPV é através do contato sexual com o parceiro infectado, porém estudos atuais afirmam que existam outras rotas de contaminação por esse vírus, as quais atingem principalmente crianças e adolescentes. A presença do DNA viral em recém nascidos, crianças e virgens, a associação do HPV genital ao carcinoma oral, além da baixa concordância entre os tipos de HPV encontrados entre mães e recém nascidos; tem comprovado a suspeita da existência de outras formas de transmissão viral. De acordo com esses dados, atualmente foi constatado que outras vias são possíveis, como o abuso

sexual, a transmissão vertical, transmissão horizontal e através de fômites (Cason et al., 1998).

O abuso sexual tem sido considerado o principal modo de transmissão e alguns autores consideram que a simples presença de condiloma em meninas pode ser um indicativo de que tenham sofrido abuso sexual (Wright et al., 1995). Porém, estudos atuais tem demonstrado a presença de lesões em meninas que não foram vítimas de violência sexual, supondo que outras rotas de contaminação viral atinjam esse grupo.

A transmissão vertical é definida pela transmissão do papilomavírus humano entre mãe e filho durante o período antinatal e no momento do parto. Presumivelmente o vírus pode ser transmitido durante a passagem do feto através do canal vaginal infectado; assim como através de uma infecção ascendente, principalmente após a prematura ruptura da membrana amniótica (Cason et al., 1995; Rice et al., 1999; Eppel et al., 2000). A presença de lesões em meninas com menos de 3 anos de idade sugere este modo de transmissão, vista que o período de latência estimado por alguns autores pode variar de 1 a 3 anos (Rehme et al., 1998). Estudos afirmam que a cesariana eletiva pode beneficiar as crianças de mães HPV positivas pela redução do índice de contaminação neonatal, principalmente por evitar a ingestão de secreções ou sangue materno infectado durante a passagem fetal através do canal do parto (Minkoff & Chervenak, 2003).

A taxa de transmissão perinatal gira em torno de 70%, sendo os outros 30% discordam entre os genótipos do HPV de mães e filhos, sugerindo que muitas dessas crianças não adquiriram o papilomavírus humano de suas mães (Cason et al., 1995; Syrjanen 2003). A transmissão horizontal esta contida dentro dessa porcentagem da população que não contrai o HPV por rota vertical, e descreve a transferência do vírus através de familiares ou pessoas contaminadas que tiveram contato com a criança; como casos de auto-inoculação digital ou por meio de outras lesões.

Ainda podemos citar a transmissão indireta ou via fômites, as quais incluem instrumentos médicos, toalhas, roupas ou qualquer objeto que esteja infectado pelo HPV.

1.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O diagnóstico da infecção por HPV leva em conta os dados da história, exame físico e exames complementares com a pesquisa direta do vírus ou indiretamente através das alterações provocadas pela infecção nas células e no tecido.

O aumento da detecção do HPV na última década chegou a 500%. Este fato pode ter sido ocasionado por avanços e descobertas dos aspectos citológicos e histológicos e pela reinterpretação das imagens da colposcopia e da peniscopia. Juntamente estão inclusos os métodos de detecção molecular, os quais possibilitam detecção e a genotipagem viral em tecidos, secreções e fluidos (Queiroz et al., 2005).

O método diagnóstico preventivo comumente usado para determinar a presença do papilomavírus humano se baseia na realização de esfregaço em lâmina de vidro com material oriundo da raspagem da superfície do epitélio cervical, fixação imediata e coloração pela técnica descrita por *Papanicolaou*. O teste de baixo custo não detecta o vírus, mas sim as alterações que ele pode causar nas células. As anormalidades intra-epitelial escamosas encontradas são descritas como alterações celulares sugestivas de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (correspondente a NIC 1 e/ou infecção por HPV) e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (correspondente a NIC 2, NIC 3 e carcinoma in situ). Indicado na rotina de rastreamento para o câncer cervical ou na presença de lesão HPV induzida no sentido de diagnóstico de neoplasia intra-epitelial ou câncer invasor associado; consegue reduzir cerca de 80% a incidência de câncer invasivo nas mulheres. A taxa média de falso negativo é cerca de 20% e a taxa de falso positivo varia entre 10 a 30% (Pereyra & Parellada, 2005).

Juntamente com o exame de *Papanicolaou* podemos citar a *Colposcopia* e *Peniscopia*, os quais permitem identificar lesões através de um aparelho chamado colposcópico que aumenta o poder de visão do médico. A indicação da metodologia

esta vinculada a suspeita da lesão cervical no momento da avaliação clínica (Nicolau, 1997).

O diagnóstico da forma clínica da infecção pelo HPV (condiloma acuminado) é confirmado por *biópsia*. O processo ocorre pela retirada de um fragmento para a análise, sendo indicados principalmente nos casos de lesões verrugosas.

Seguida da *biópsia*, pode-se realizar a *análise histopatológica* para a confirmação dos resultados, porém os métodos descritos acima não permitem determinar o genótipo viral presente e pode apresentar resultados falsos negativos. Por estas razões, a análise molecular é considerada a metodologia mais sensível, capaz de determinar a presença e o tipo viral simultaneamente.

Entre as diversas técnicas moleculares utilizadas para a detecção viral podemos citar a *Captura Híbrida*, que associa métodos de hibridização molecular e anticorpos monoclonais detectando com alta sensibilidade e especificidade o DNA do HPV, assim como a carga viral, em amostras de escovado ou biópsia do trato genital inferior (Bistoletti & Lidbrink 1988)

O método de *Hibridização in situ* permite localizar o DNA ou RNA viral de forma específica em células definidas ou mesmo em cromossomos isolados, sendo o único método que permite a localização dos genomas virais em relação à topografia do tecido. É uma técnica laboriosa e de baixa sensibilidade com melhores resultados quando combinada com a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Schneider et al., 1987).

A *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)* é a metodologia mais confiável e sensível utilizada em muitos laboratórios (Manos et al., 1989; Snijders et al., 1990), sendo considerada atualmente a técnica de escolha dos estudos epidemiológicos (Schiffman, 1992). O método possibilita a detecção de um grande número de tipos de HPV em uma única reação de PCR através da aplicação de pares de iniciadores (*primers*) *consensus* e universais, uma vez que os diferentes genótipos do vírus dividem regiões de alta homologia.

A construção dos *primers* baseia-se na região L1 (Manos et al., 1989; Yoshikawa et al., 1990; Snijders et al. 1990) e nas regiões E6/E7 do genoma do HPV (Resnick et

al. 1990), sendo a primeira mais comumente usada na detecção do DNA do vírus por possuir um maior espectro de determinação viral com resultados mais sensíveis e precisos. Por esse motivo, os iniciadores mais utilizados são os *primers* MY09 e MY11 (Manos et al. 1989), que são *primers* degenerados e capazes de amplificar mais de 25 tipos de HPV genital; e os *primers* GP05 e GP06 (Snijders et al. 1990), que são iniciadores *consensus* e estão localizados dentro da sequência de reconhecimento do *primer* MY, o que permite utilizá-lo como *primers* únicos ou em uma reação de *nested PCR* (Evander et al. 1992).

Os protocolos em estudo se tornam mais confiáveis quando se associa a PCR a metodologia de *Polimorfismo de Fragmentos de DNA* (RFLP) obtidos por enzima de restrição ou ao sequenciamento do genoma viral, visto que é possível detectar e determinar o tipo do vírus presente na amostra analisada e classificá-la em alto ou baixo risco para o desenvolvimento de neoplasia, com uma redução de resultados falsos positivos.

Hoje, a união dessas três metodologias (PCR, RFLP e sequenciamento) é o padrão ouro para os estudos e o diagnóstico do papilomavírus humano.

1.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO HPV

Atualmente a infecção por HPV é comum, tratável e passível de prevenção. Como não existe cura para este vírus, a detecção precoce e cuidados adequados para a remoção dos condilomas visíveis são importantes para a prevenção de lesões malignas, mesmo sabendo que a regressão espontânea dos condilomas pode ocorrer em até 20% dos casos; o atraso no tratamento pode levar a disseminação local tornando as lesões mais extensas e conseqüentemente aumentando a possibilidade do desenvolvimento de tumores na vulva, vagina, reto e pênis (Della Torre et al., 1992).

De acordo com a localização, os aspectos clínicos da infecção e a faixa etária atingida; diversas abordagens terapêuticas devem ser estudadas para a escolha da mais apropriada, resultando em um único objetivo: completa erradicação das lesões com total eliminação viral (Gal, 2001).

Os tratamentos se baseiam em métodos químicos, quimioterápicos, imunoterápicos e cirúrgicos ou a combinação dessas modalidades. Entre os métodos químicos, os mais utilizados são o *ácido tricloraacético* a 80% - 90% e a *podofilina*; entre os quimioterápicos encontramos o *5 fluorouracil (5-FU)* e a *interleucina 2*; entre os imunoterápicos o *Interferon alfa e beta*, *imiquimod* e *retinóides* e por fim, nos métodos cirúrgicos temos a *cauterização*, *excisão com tesoura*, *excisão com bisturi* e os mais atuais que são *excisão com alça de cirurgia de alta frequência (CAF)* e o *laser* (Pereyra & Parellada, 2005).

Cada método apresenta eficácia, limitação, efeitos adversos e complicações específicas; sendo que em quase todos os tipos de tratamento encontramos resposta em torno de 50 a 75%, sendo as recorrências em torno de 30%. Aproximadamente 80% dos pacientes obtêm cura dentro do primeiro ano de tratamento, o restante (20%) necessitará de terapias múltiplas a longo prazo (Ferenczy, 1999).

Para o alcance de melhores resultados, deve-se combater esse tipo de microorganismo através do sistema imunológico dos indivíduos que podem ser beneficiados pelo uso das vacinas. A clara associação entre a infecção pelo HPV e o câncer cervical indicam que o HPV serve como um alvo ideal para o desenvolvimento de vacinas preventivas.

Não há estudos que comprovem o desenvolvimento de vacinas terapêuticas capazes de combater infecções virais pré-existentes e lesões associadas; porém, recentemente foram desenvolvidas duas vacinas profiláticas contra o papilomavírus humano, a vacina quadrivalente Gardasil (HPV 6/11/16/18) pela Merck e a vacina bivalente Cervarix (HPV 16/18) pela Glaxo SmithKline – GSK, que são recomendadas pela US Food and Drug Administration (FDA) para todos os países do mundo (Hung et al., 2007; Medeiros et al., 2009) .

As vacinas são compostas por partículas como vírus (VLPs) do HPV que são capazes de gerar anticorpos neutralizantes contra o maior capsídeo protéico da proteína viral (L1). As duas vacinas oferecem proteção contra infecção dos dois tipos de HPV mais comum por causar câncer, HPV 16 e 18, os quais estão associados com mais de 70% do câncer cervical; e a vacina quadrivalente ainda protege contra os responsáveis por 80 a 90% dos casos de verrugas genitais, HPV 6 e 11 (Torre et al., 2007). Estudos têm demonstrado que além da imunização alvo, pode ainda ocorrer à proteção cruzada contra HPV 31, 33 e 45 (Wheeler et al., 2009).

De acordo com dados da literatura, a eficácia da vacina na prevenção da infecção persistente do HPV e HPV associados a doenças varia entre 90 a 100%, sendo previstas para imunizar o indivíduo por 9 anos e 7.3 anos a Gardasil e a Cervarix, respectivamente (De Carvalho et al., 2010; Munoz et al., 2010).

Inicialmente o uso destas vacinas foi licenciado para meninas e mulheres na idade entre 9 a 26 anos de idade que não tiveram contato prévio com o vírus, entretanto, hoje, são liberadas também para meninos e mulheres em qualquer faixa etária. Geralmente a idade de vacinação inicia aos 12 anos, variando de acordo com os países entre 11 a 14 anos de idade.

Estudos atuais expressam a necessidade de avaliar a oportunidade de iniciar programa de vacinação em outros grupos potenciais, como aqueles que possuem dados que comprovem o perfil de risco. Entretanto, mais pesquisas são necessárias especialmente para o grupo de meninas na idade abaixo de nove anos; pois faltam estudos que caracterize esta população como de baixo ou alto risco para as infecções por HPV.

A forma de prevenção viral esta disponível no Brasil apenas na rede particular de saúde, com custo elevado, restringindo ainda mais a parte da população que pode ser beneficiar profilaticamente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença do Papilomavírus Humano em amostras de meninas até nove anos de idade provenientes do ambulatório de ginecologia Infante Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (ES).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o Papilomavírus Humano através da PCR comparando dois diferentes iniciadores nas amostras de meninas atendidas no ambulatório de ginecologia Infante Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória.
- Identificar o genótipo viral e o grau de agressividade através do método de RFLP e/ou sequenciamento nas amostras que forem positivas para a presença do vírus e comparar as metodologias aplicadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, analítico e de corte-transversal que analisou a presença do papilomavírus humano e o seu grau de agressividade em relação ao desenvolvimento de câncer, correlacionando com as possíveis formas de transmissão viral, por meio de amostras de meninas com até nove anos de idade originadas do ambulatório de ginecologia Infanto Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

Este ambulatório possui um serviço de atendimento médico ginecológico a meninas e adolescentes da região de Vitória e metropolitana atendidas pelo sistema único de saúde (SUS) e também advindas de outros municípios.

3.1.1 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico/UFES (nº de registro 205/10), em reunião realizada em 08 de dezembro de 2010 (Anexo 1).

3.2 AMOSTRAS ESTUDADAS

As amostras estudadas foram obtidas de 43 meninas com idade de 0 a 9 anos que procuraram o ambulatório de ginecologia Infanto Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória para atendimento médico de rotina durante o período entre Dezembro de 2010 a Dezembro de 2011. O cálculo amostral foi realizado através do

programa Epi-Info (versão 3.5.1; Center for Disease Control and Prevention) com base na média anual de meninas abaixo de nove anos do estado do Espírito Santo (119.736), segundo IBGE, e na frequência máxima do HPV genital encontrado em meninas (20%). As amostras permitiram resultados com erro alfa se aproximando de 10, com intervalo de confiança 95%.

Dentre os critérios de inclusão, as meninas não deveriam ter necessariamente histórico de verrugas genitais ou infecção por HPV; deveriam ter a idade estabelecida e o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável legal (Anexo 2).

3.2.1 Avaliação Epidemiológica

Este critério possui a finalidade de promover o melhor entendimento sobre a vida da paciente e suas relações pessoais, sendo um complemento ao estudo que disponibiliza informações necessárias para a determinação das possíveis formas de transmissão do HPV e à correlação futura com as medidas preventivas disponíveis para este grupo de risco.

A avaliação foi composta por um questionário, que neste caso foi respondido pelo responsável legal antes que a coleta da amostra fosse realizada. A entrevista foi realizada pelo pesquisador responsável. As perguntas em relação às pacientes eram referentes à: idade, via de parto, duração do trabalho de parto, atividade sexual, abuso sexual, presença de verrugas genitais e o local da lesão por HPV. Enquanto que as questões relacionadas à família das meninas incluíram: estado civil, histórico de HPV na família (mãe, pai, irmãos ou cuidadores), histórico de HPV durante a gestação, histórico de imunodepressão (HIV – vírus da imunodeficiência humana) e lesão por HPV durante o parto (Anexo 3).

3.2.2 Coleta das Amostras

As 43 amostras foram obtidas durante a consulta médica. Todas as meninas com idade até nove anos foram incluídas na pesquisa, inclusive aquelas que não possuíam histórico de verrugas genitais ou lesões por HPV (n= 40) ou as que possuíam verrugas genitais (n=3). Foram excluídas as meninas HIV positivas, uma vez que o laboratório onde a pesquisa foi realizada não possui a estrutura suficiente para receber esse tipo de amostra.

A coleta foi realizada através da raspagem de lesões ou raspagem da região considerada suspeita: região da vulva, períneo, anal e perianal; com o auxílio de uma escova ginecológica. Em seguida, a escova foi mergulhada em um tubo falcon, devidamente identificado, contendo 500 µl de solução de LoTE (Low Tris-EDTA) e permaneceu embebida nesta solução a temperatura ambiente até o momento da extração do DNA, que não ultrapassou 24 horas.

As etapas seguintes referentes ao processo de laboratório foram realizadas no laboratório do Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA seguiu o protocolo do Fenol-Clorofórmio e precipitação com etanol e acetato de amônio padronizado anteriormente pelo NGHM.

Os tubos falcon contendo as amostras foram vigorosamente vortexados e centrifugados por 1 minuto a 3.200 r.p.m. para que as células aderidas a escova se soltassem e permanecessem apenas na solução de LoTE. Em seguida, a escova foi

retirada do tubo e descartada; e a amostra foi transferida para um microtubo de 1,5 ml de polipropileno.

O microtubo foi centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos, seguido da retirada do sobrenadante e permanência no tubo de aproximadamente 50 µl da amostra, a qual foi ressuspensa. O volume foi completado para 405 µl com TE9 (Tris EDTA pH9), seguido do adicional de 45 µl de SDS-proteinase K (5mg/ml em 10% de SDS). A amostra foi incubada em banho-maria por 2 horas a 56°C.

Após a incubação, foi iniciado o processo de extração orgânica, onde foi adicionado 450 µl de PC9 (Phenol Chloroform pH 9) a amostra, sendo posteriormente homogenizada por 1 minuto. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 14000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante aquoso transferido para um novo tubo. Este procedimento foi repetido mais uma vez.

A finalização da extração ocorreu através da precipitação da amostra com EtOH. Após a extração orgânica, o tubo deve possuir um volume prévio de 400 µl, no qual é adicionado 100 µl de 10M NH₄Ac e 1ml de etanol 100% gelado e a amostra foi levada ao freezer a -20°C durante 20 minutos. Após este período de incubação, o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos, todo o líquido foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% gelado. Novamente o tubo foi centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos e posteriormente todo o líquido foi descartado, devendo o tubo permanecer de cabeça para baixo por 15 minutos para que seque o líquido que ainda existir. Finalmente, após a secagem, o DNA extraído foi eluído em 25 µl de LoTE e incubado por 15 minutos a 37°C. O DNA para uso foi armazenado em geladeira a 4°C.

3.4 DETECÇÃO DO DNA VIRAL

A metodologia usada para a detecção do papilomavírus humano foi a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que possibilita detectar um grande número de genótipos do HPV que são capazes de infectar o trato anogenital.

3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase

As sequências dos iniciadores ou *primers* MY09/MY11 e GP05/GP06 foram escolhidas por apresentarem melhores resultados referentes à sensibilidade e especificidade na detecção do DNA viral, sendo capazes de amplificar uma ampla variedade de tipos de HPV em uma única reação de PCR. Ambos iniciadores amplificam fragmentos da região L1 do genoma e são denominados de *primer* degenerado (MY09/MY11) e *primer consensus* (GP05/GP06); sendo capazes de gerar produto da amplificação da PCR de aproximadamente 450 pb e aproximadamente 140 pb, respectivamente (Tabela 1).

No estudo atual, adotamos os iniciadores GP05/GP06 como *primer* externo, uma vez que quando usado como *nested* do *primer* MY09/MY11, o número de resultados falso positivos aumentam, conseqüentemente diminui a confiabilidade dos estudos.

As condições do programa de amplificação estão demonstradas na Tabela 2. Para cada reação de PCR e igualmente para os dois iniciadores, um volume de 5,0 µl de DNA foi adicionado a mistura de reagentes, contendo 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 0,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, tampão da Platinum Taq DNA polimerase 1X, os pares de iniciadores na concentração final de 1,0 µM cada e água ultra pura para completar o volume final de 25 µl.

Tabela 1 – Iniciadores usados para a amplificação do HPV

Iniciador	Sequência* (5'-3')	Fragmento amplificado(pb)	Referência
MY 11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	≈ 450	(Manos et al., 1989)
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC		
GP05	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	≈ 140	(Snijders et al., 1990)
GP06	GAAAAATAAACTGTAAATCA		

*M = A + C, R = A + G, W = A + T, Y = C + T, I, iosine.

Tabela 2 – Programa de amplificação usado na PCR

Iniciador	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Nº de ciclos
MY09/MY11	94°C, 7 min	94°C, 45s	55°C, 45s	72°C, 45s	72°C, 7 min	35
GP05/GP06	94°C, 7 min	94°C, 45s	45°C, 45s	72°C, 45s	72°C, 7 min	35

Todas as reações de amplificação para os dois pares de *primers* foram realizadas em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) na presença de um controle positivo (HPV positivo) e dois controles negativos, sendo o primeiro com amostra de sangue sem DNA viral e o segundo com o DNA substituído por água ultra pura. Os controles são aplicados para a confirmação da amplificação da reação e para assegurar a ausência de contaminação nas reações de PCR.

3.4.2 Eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida

A presença ou ausência de fragmentos de DNA do HPV e os controles negativos e positivo foram verificados através da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. A

corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 7% [7 ml de acrilamida 40%, 4 ml de TBE 10X, 280 µl de APS (persulfato de amônio) 10%, 28 µl de TEMED e água destilada para o volume final de 40 ml] por duas horas e trinta minutos, sob uma corrente elétrica de 220 volts.

3.4.3 Método de Impregnação pela Prata

Após a eletroforese, o gel foi corado através do método de impregnação pela prata, seguindo as seguintes etapas: tratamento do gel em solução fixadora (Etanol absoluto 10%, ácido acético 0,5% e água destilada) por 6 min e, após remoção, incubado em solução de nitrato de prata 0,1% por 10-15 min, seguida por lavagem com água. O gel foi então incubado em solução reveladora (formaldeído 0,1%, hidróxido de sódio 1,5% e água destilada) para redução da prata e visualização das bandas. O gel foi arquivado com o sistema de fotodocumentação de géis (VilberLourmat®).

3.4.4 Interpretação dos Resultados Obtidos pelo Método de PCR

A presença do DNA viral nas amostras analisadas gera fragmentos de aproximadamente 450 pb para o *primer* degenerado e aproximadamente 140 pb para o *primer consensus*.

A detecção do DNA do HPV utilizando os dois pares de iniciadores para cada amostra aumenta a confiabilidade dos resultados, mesmo quando ocorre a amplificação do DNA viral em apenas um dos dois pares de *primers*. Quando isto

ocorre, consideramos inicialmente o resultado positivo com a confirmação na metodologia de genotipagem viral.

Em todas as reações de PCR, além das amostras em análise, incluímos os controles. No caso do controle positivo, é possível visualizar no gel a banda referente à presença do DNA viral e o tamanho será de acordo com o iniciador usado na reação; enquanto que nos controles negativos, a confirmação que a reação funcionou e que está livre de contaminação se dá pela ausência de bandas no gel.

As amostras que foram positivas para o DNA viral, são submetidas à metodologia para determinar o tipo de HPV presente em cada paciente.

3.5 DETERMINAÇÃO DO TIPO VIRAL

Considerando o HPV como um agente infeccioso que participa ativamente da gênese do câncer de colo uterino, e que os tipos de HPV apresentam graus de agressividade diferente, é fundamental a determinação do risco para cada paciente infectado.

Devido a isso, as amostras positivas para o Papilomavírus Humano na PCR, são submetidas à clivagem por enzimas de restrição e/ou o sequenciamento para a determinação do tipo viral presente na amostra e a posterior classificação em alto ou baixo risco para o desenvolvimento de câncer.

As amostras HPV positivas amplificadas pelo *primer* MY09/MY11 foram submetidas ao RFLP e ao sequenciamento, quando necessário; porém a identificação viral das amostras amplificadas pelo *primer* GP05/GP06 só foi possível através do sequenciamento, uma vez que não há enzimas de restrição com sítios de cortes padronizados para esse iniciador *consensus*.

3.5.1 Digestão dos Produtos Amplificados pelo Método de RFLP

As enzimas usadas no estudo foram a Dde I e a Rsa I (Life Technologies GIBCO/BRL), que são capazes de digerir o fragmento de 450 pb em diferentes tamanhos, gerando um padrão de bandas característico de cada tipo de HPV.

Após a reação de PCR, os produtos que foram positivos para o papilomavírus humano foram submetidos à digestão durante 4 horas em banho-maria a 37°C por ambas enzimas de restrição (Dde I e Rsa I). As condições para a clivagem dos fragmentos de DNA estão descritas na tabela 3.

Para cada digestão realizada, foram incluídos controle positivo (amostra HPV positiva) e dois controles negativos, sendo o primeiro com amostra de sangue sem contaminação com DNA viral e o segundo com o produto da PCR substituído por água ultra pura.

Tabela 3. Componentes ideais de cada enzima

Enzima	Produto de PCR	Tampão	Enzima	Água ultra pura
Enzima Dde I	3,0 µl	Tampão 3: 1X	1U	Completar para 20 µl
Enzima Rsa I	3,0 µl	Tampão 1: 1X	1U	Completar para 20 µl

3.5.1.1 Eletroforese Vertical em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese foi realizada nas amostras digeridas pelas enzimas Rsa I e Dde I, a fim de visualizar a separação dos fragmentos digeridos para posterior análise e determinação do tipo viral. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 7% [7 ml de acrilamida 40%, 4 ml de TBE 10X, 280 µl de APS (persulfato de amônio) 10%, 28 µl de TEMED e água destilada para o volume final de 40 ml] por uma hora e trinta minutos, sob uma corrente elétrica de 220 volts.

3.5.1.2 Método de Impregnação pela Prata

O método de impregnação pela prata foi realizado conforme descrito no tópico 3.4.3

3.5.1.3 Interpretação dos Resultados Obtidos pelo Método de RFLP

Os fragmentos amplificados pela metodologia de PCR foram submetidos ao método de RFLP, para que a digestão enzimática pudesse gerar um padrão de corte característico de cada tipo de HPV.

A enzima Dde I reconhece e cliva o produto em C↓TNAG, enquanto a enzima Rsa I reconhece e cliva o produto em GT↓AC; gerando, as duas, perfis de cortes diferentes. Para a análise do padrão de corte, é necessário o auxílio da tabela 4 descrita em 1994 por Bernard et al. para a identificação do tipo de HPV presente na amostras em análise.

Tabela 4. Padrão RFLP do fragmento de DNA de vários tipos de HPV, amplificados com os iniciadores MY09/MY11 e clivados com as enzimas de restrição Dde I e Rsa I, segundo Bernard et al. (1994)

Tipo de HPV	Digestão com Dde I	Digestão com Rsa I
HPV 6	382pb, 67pb	161pb, 149pb, 72pb, 67pb
HPV 11	447pb, 2pb	216pb, 135pb, 72pb, 26pb
HPV 13	326pb, 67pb, 62pb	175pb, 135pb, 73pb, 72pb
HPV 16	452pb	310pb, 72pb, 70pb
HPV 18	432pb, 23pb	135pb, 125pb, 85pb, 72pb, 38pb
HPV 26	455pb	365pb, 72pb, 18pb
HPV 31	283pb, 167pb, 2pb	380pb, 72pb
HPV 32	320pb, 108pb, 21pb	216pb, 161pb, 72pb
HPV 33	320pb, 77pb, 52pb	236pb, 102pb, 72pb, 39pb
HPV 34	211pb, 151pb, 88pb, 8pb	186pb, 161pb, 96pb, 15pb
HPV 35	294pb, 135pb, 23pb	177pb, 161pb, 72pb, 42pb
HPV 39	324pb, 131pb	260pb, 123pb, 72pb
HPV 40	297pb, 158pb	365pb, 90pb
HPV 42	341pb, 108pb	242pb, 135pb, 72pb
HPV 44	297pb, 112pb, 46pb	222pb, 161pb, 72pb

HPV 45	324pb, 131pb	338pb, 72pb, 45pb
HPV 51	362pb, 90pb	380pb, 72pb
HPV 52	357pb, 92pb	449pb
HPV 53	206pb, 158pb, 85pb	449pb
HPV 54	452pb	138pb, 125pb, 117pb, 72pb
HPV 55	112pb, 111pb, 101pb, 85pb, 46pb	165pb, 161pb, 72pb, 57pb
HPV 56	307pb, 142pb	310pb, 72pb, 49pb, 18pb
HPV 57	211pb, 142pb, 50pb, 46pb	449pb
HPV 58	348pb, 101pb	306pb, 111pb, 32pb
HPV 59	452pb	452pb
HPV 61	455pb	185pb, 180pb, 100pb
HPV 62	449pb	359pb, 72pb, 18pb
HPV 64	211pb, 151pb, 87pb, 9pb	186pb, 161pb, 72pb, 39pb
HPV 66 (PAP88)	291pb, 158pb	449pb
HPV 67	307pb, 92pb, 50pb	310pb, 72pb, 67pb
HPV 68 (ME 180)	455pb	260pb, 85pb, 72pb, 38pb
HPV 69	455pb	365pb, 72pb, 18pb

MM4 (W138)	288pb, 167pb	383pb, 72pb
MM7 PAP(291)	452pb	380pb, 72pb
MM8 PAP (155)	220pb, 142pb, 90pb	310pb, 142pb
MM9 PAP (238)	243pb, 215pb	201pb, 161pb, 96pb
HPV 72 (LVX100)	297pb, 155pb	362pb, 72pb, 18pb
HPV IS39	243pb, 212pb	383pb, 72pb

A necessidade do uso de duas ou mais enzimas para a determinação do tipo viral é devido ao padrão de corte gerado por cada uma, pois uma enzima pode gerar padrão de corte muito parecido para tipos diferentes de HPV. Logo, o que irá definir o tipo viral presente na amostra é a segunda enzima usada no estudo.

3.5.2 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados pela PCR

Os fragmentos de DNA viral que não foram submetidos à metodologia de RFLP ou que geraram dúvidas no padrão de corte quando digeridos com as enzimas de restrição, foram sequenciados no Laboratório de Biotecnologia da Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

Alguns procedimentos foram realizados antes do envio das amostras para o sequenciamento, como descritos abaixo.

3.5.2.1 Purificação dos Produtos da PCR

O produto de PCR foi purificado previamente à realização da reação do sequenciamento para retirada dos nucleotídeos não incorporados e do excesso de iniciadores. A purificação foi realizada utilizando o reagente ExoSAP-IT (USB[®]) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific[®]), utilizando-se 2 µl de cada amostra.

3.5.2.2 Preparação das Amostras a Serem Sequenciadas

Devido os *primers* usados no estudo serem específicos e não universais, antes que as amostras fossem enviadas para o sequenciamento, houve a necessidade de adicionar os iniciadores usados a amostra a ser sequenciada.

A cada amostra purificada foi adicionado 3.2 pmol de *primer* (MY09 ou GP06) e água ultra pura para completar 7,0 µl.

As amostras foram devidamente identificadas e enviadas para o sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia da pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília no sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems.

3.5.2.3 Análise dos Resultados do Sequenciamento

A análise dos resultados do sequenciamento foi realizada utilizando o programa BioEdit; e através do alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidas, analisamos por similaridade no BLAST com sequências similares disponíveis no banco de dados genéticos (NCBI).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos casos de variáveis categóricas foi usado o teste exato de Fisher, para verificar a significância estatística das tabelas de frequência 2x2 de amostras independentes.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0, considerando-se estatisticamente significativo para todos os resultados o valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO

Um total de 43 meninas foram incluídas no estudo e selecionadas aleatoriamente, independente do fator que as levaram a ser atendidas no ambulatório de ginecologia Infante Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória. As principais características epidemiológicas da população estuda estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Características epidemiológicas da população estudada

Amostras	Casos HPV Positivo Nº amostras (%)	Casos HPV Negativo Nº amostras (%)	Total = 43 Nº amostras (%)
Idade (anos)			
0-9 anos	6 (13,9)	37 (86,1)	43 (100)
Vias de Parto			
Vaginal	4 (9,3)	21 (48,8)	25 (58,1)
Cesariana	2 (4,7)	15 (34,9)	17 (39,6)
Desconhecido	0	1 (2,3)	1 (2,3)
Atividade Sexual			
Sim	0	0	0
Não	6 (13,9)	35 (81,4)	41 (95,3)
Desconhecido	0	2 (4,7)	2 (4,7)
Abuso Sexual			
Sim	0	0	0
Não	6 (13,9)	35 (81,4)	41(95,3)
Desconhecido	0	2 (4,7)	2 (4,7)
Presença Verrugas Genitais			
Sim	3 (7)	0	3 (7)
Não	3(7)	37 (86)	40 (93)
HPV na Família			
Mãe	0	4 (9,3)	4 (9,3)
Pai	0	2 (4,7)	2 (4,7)
Quem cuida	0	4 (9,3)	4 (9,3)
HPV durante Gestação			
Sim	0	1 (2,3)	1 (2,3)
Não	6 (13,9)	31 (72,1)	37 (86)
Desconhecido	0	5 (11,7)	5(11,7)
HIV na Família			
Sim	0	3 (7)	3 (7)
Não	6 (13,9)	31 (72,1)	37 (86)
Desconhecido	0	3 (7)	3 (7)

A idade das meninas analisadas variou entre 0 a 9 anos, com uma média de 6,1 anos (variando entre 5,3 e 6,9 anos). Entre as amostras submetidas ao estudo, o Papilomavírus Humano foi detectado em 6 (13,9%) meninas; destas, somente três (7%) tiveram verrugas genitais clinicamente aparente ou achados colposcópicos sugestivos de infecção subclínica pelo HPV, enquanto que as outras três HPV positivas tinham um exame genital normal. O vírus atingiu as pacientes na idade entre 4-9 anos, com média de sete anos (variando de 4,6 – 9,4 anos).

Na população estudada, não foi relatado qualquer indivíduo que sofreu abuso sexual ou tiveram algum tipo de atividade sexual. Quanto à história do HPV na família das pacientes, 9,3% das mães, 4,7% dos pais e 9,3% de cuidadores foram positivos para o vírus em algum momento da vida, entretanto, nenhum dos casos positivos estavam associados com o casos de HPV nas amostras de meninas.

De acordo com a análise estatística, não encontramos diferença estatisticamente significativa ($p=1$) para os seguintes tópicos: HPV detectado em meninas nascidas por cesárea ou parto vaginal, história de HPV durante a gestação e história de HIV na família. Contudo, quando analisamos a presença de verrugas genitais nas amostras analisadas, observamos uma forte associação com a detecção do papilomavírus humano, sendo o valor estatisticamente significativo ($p<0,0016$).

4.2 DETECÇÃO DO DNA VIRAL ATRAVÉS DO MÉTODO DA PCR

Antes que fosse realizada a reação em cadeia da polimerase nas amostras extraídas, elas foram quantificadas com média de concentração de DNA de 11,9 ng/ μ l.

Em seguida, todas as amostras foram submetidas à reação de PCR com os pares de *primers* MY09/MY11 e GP05/GP06, que são responsáveis por amplificar fragmentos de aproximadamente 450pb e 140 pb, respectivamente (figura 5 e 6)

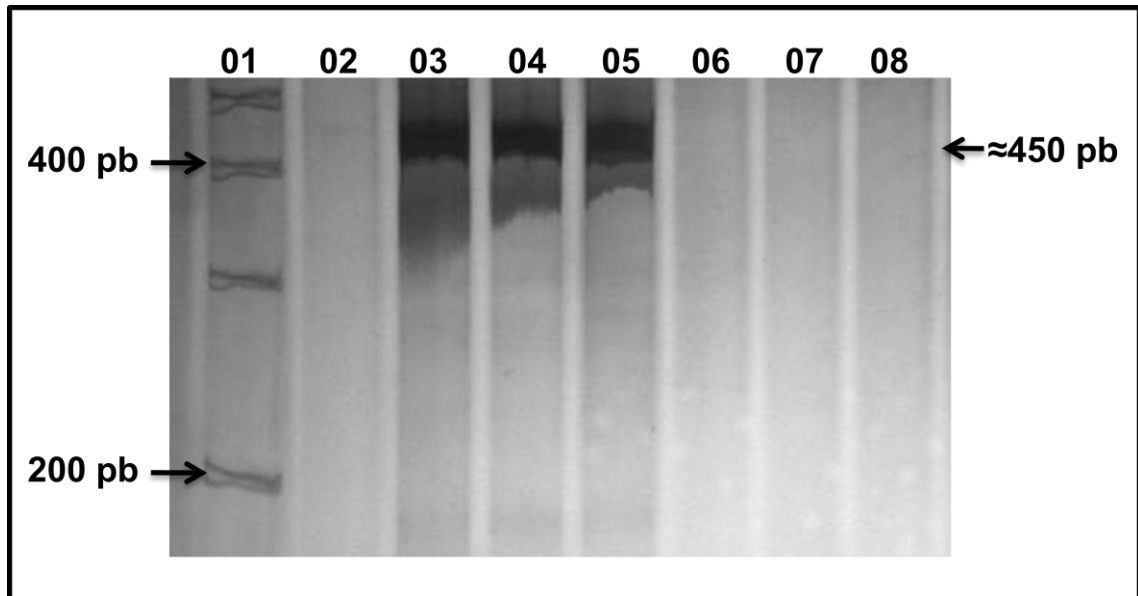


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida do *primer* MY09/MY11. Coluna 01: marcador de peso molecular de 100 pb. 02: controle negativo (amostra de sangue) sem DNA viral. 03: controle positivo para HPV. 04 e 05: amplificação do fragmento de interesse nas amostras analisadas – HPV positivas. 06 e 07: amostras de pacientes HPV negativas. 08: controle negativo com água sem a presença de DNA viral.

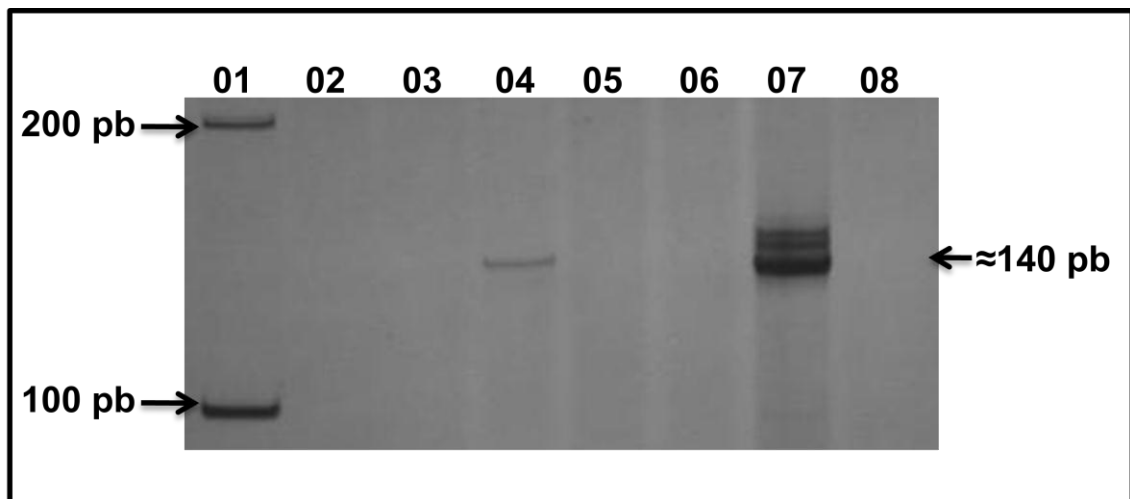


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida do *primer* GP05/GP06. Coluna 01: marcador de peso molecular de 100 pb. 02: controle negativo (amostra de sangue) sem DNA viral. 03: amostra da paciente HPV negativa. 04. amplificação do fragmento de interesse na amostra analisada – HPV positiva. 05 e 06: amostras de pacientes HPV negativas. 07: controle positivo para HPV. 08: controle negativo com água sem a presença de DNA viral.

Entre as 43 meninas analisadas, foi possível detectar o papilomavírus humano em seis pacientes (amostras: 001, 003, 010, 020, 025 e 030). O iniciador MY09/MY11 possibilitou determinar a presença do DNA viral em quatro (66,67%) das seis amostras HPV positivas, enquanto que o *primer* GP05/GP06 detectou o vírus nas seis amostras positivas (100%).

Todas as amostras em análise foram submetidas à pelo menos duas reações da PCR com cada par de *primer* para a confirmação dos resultados. Além disso, todas as reações da PCR foram realizadas com controles negativos e controle positivo, os quais evidenciaram a não ocorrência de contaminação na metodologia aplicada.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TIPO VIRAL DAS AMOSTRAS HPV POSITIVAS

4.3.1 Resultados do Método de RFLP

As quatro amostras (pacientes: 001, 003, 010 e 025) amplificadas pelo *primer* MY09/MY11 foram submetidas ao método de RFLP com as enzimas de restrição Dde I e Rsa I para a determinação do tipo viral. Porém, entre as quatro amostras HPV positivas, só foi possível identificar o tipo viral através do método de RFLP em três (pacientes: 001,003 e 025) .

A genotipagem viral realizada pelo método de RFLP esta representada na figura 7.

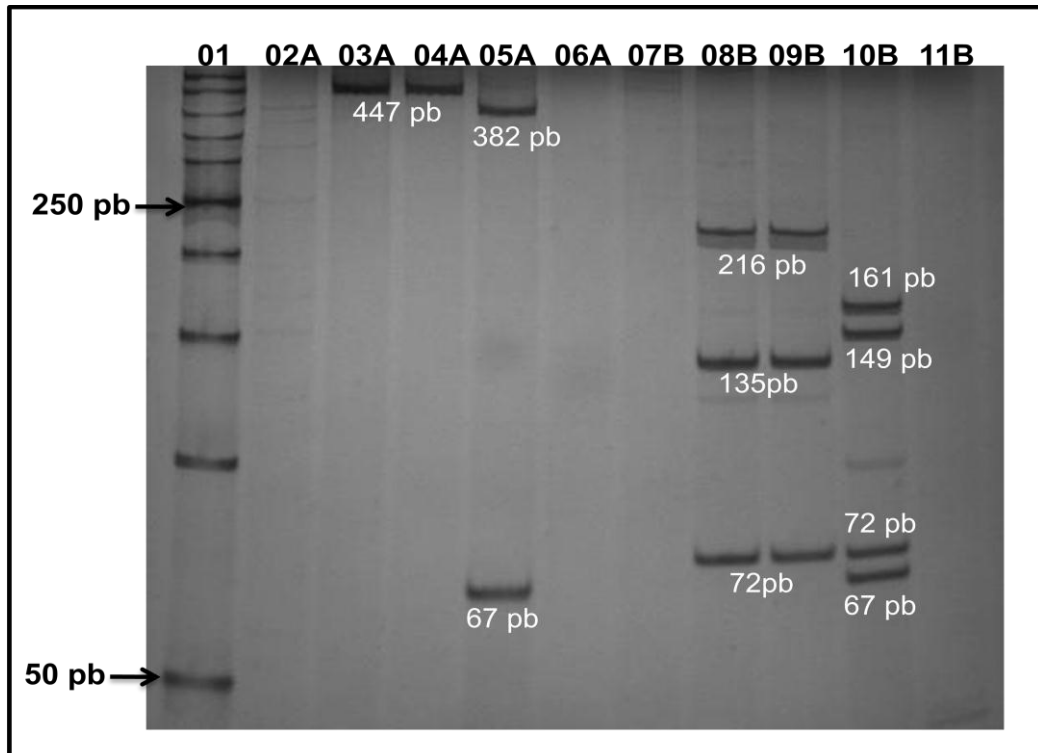


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida do produto da digestão com as enzimas Dde I e Rsa I. Coluna 01: marcador de peso molecular de 50 pb. A: Digestão com a enzima Dde I. 02A: controle negativo (amostra de sangue) sem DNA viral. 03A: controle positivo para HPV tipo 11. 04A: paciente 003 HPV positivo. 05A: paciente 001 HPV positivo. 06A: controle negativo com água ao invés do DNA viral. B: Digestão com a enzima Rsa I. 07B: controle negativo (amostra de sangue) sem DNA viral. 08B: controle positivo para HPV tipo 11. 09B: paciente 03 HPV positivo. 10B: paciente 01 HPV positivo. 11B: controle negativo com água ao invés do DNA viral.

De acordo com o padrão de corte gerado por cada enzima e para cada uma das três pacientes, juntamente com a consulta da tabela padronizada com o tamanho das bandas e o tipo de HPV (tópico 3.5.1.3), foi possível identificar os genótipos virais presentes nas amostras HPV positivas.

A enzima Dde I cortou o produto de PCR da paciente 003 e da paciente 025 (paciente HPV positiva não representada na figura acima) em bandas de 447 pb e 2 pb. Enquanto que a enzima Rsa I, gerou um padrão de corte para essas duas paciente de 216 pb, 135 pb, 72 pb e 26 pb. As bandas de peso molecular muito pequeno (menor que 50 pb) não foram possíveis de visualizar, uma vez que elas caíam do gel durante a corrida eletroforética.

Em relação à amostra 001, a enzima Dde I gerou um padrão de bandas de 382 pb e 67 pb; e a enzima Rsa I originou fragmentos de 161 pb, 149 pb, 72 pb e 67 pb.

Quando consultamos a tabela padrão de RFLP observamos que o HPV identificado nas amostras 003 e 025 é do tipo 11 e o HPV determinado na paciente 001 é do tipo 06. Os genótipos do HPV determinados para as três meninas são classificados em HPV de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias (tabela 6).

Tabela 6. Genótipos virais e padrões de corte identificados nas pacientes HPV positivas através do método de RFLP

Tipo de HPV	Digestão com Dde I	Digestão com Rsa I
HPV 6	382pb, 67pb	161pb, 149pb, 72pb, 67pb
HPV 11	447pb, 2pb	216pb, 135pb, 72pb, 26pb

A quarta amostra positiva para o HPV (amostra 010) e amplificada pelo *primer* MY09/MY11 também foi submetida ao método de RFLP, porém não foi possível definir o genótipo viral, pois as bandas geradas estavam muito claras e com padrão de corte diferente da tabela padrão. Por esta razão, a genotipagem foi realizada através de sequenciamento.

O padrão de corte descrito na literatura para as enzima Dde I e Rsa I relacionadas ao papilomavírus humano é referente apenas ao par de *primer* MY09/MY11; porém decidimos fazer um teste de digestão enzimática, usando essas mesmas enzimas, com o produto da PCR do *primer* GP05/GP6.

Foram realizados testes com diferentes amostras HPV positivas, porém todos os resultados foram negativos para as duas enzimas, demonstrando que elas não conseguem cortar produtos da PCR amplificados pelo iniciador GP05/GP06.

4.3.2 Resultados Através do Sequenciamento

Os tipos virais do papilomavírus humanos diferenciam entre si por mudanças de bases em sua sequência, podendo ser visualizadas através do sequenciamento.

A figura 8 expõe essa diferença entre os genótipos de HPV, demonstrado parte do sequenciamento realizado com o produto da PCR do iniciador GP05/GP06 para as amostras 003 e 020; onde os tipos detectados foram o HPV 11 e o HPV 42, A e B respectivamente.

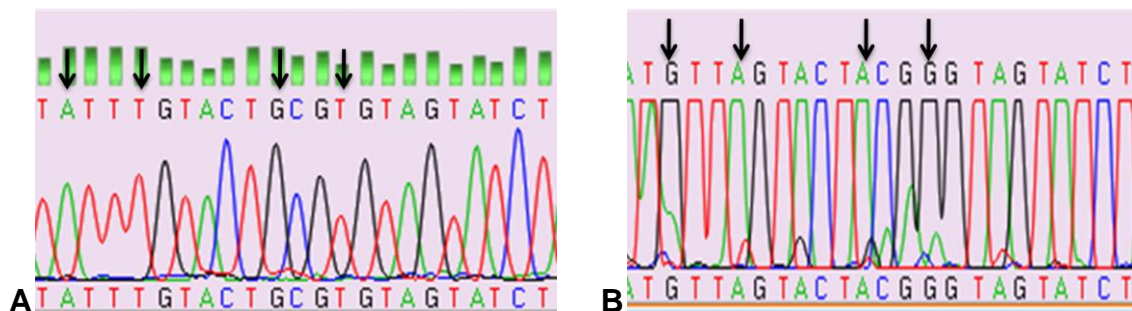


Figura 8: Sequenciamento de duas amostras HPV positivas pelo iniciador GP05/GP06, demonstrando a mudança de bases no genótipo de dois diferentes tipos virais. A: HPV tipo 11. B: HPV tipo 42.

Devido o sequenciamento conseguir detectar essa pequena diferença entre os genótipos virais, é que ele se tornou uma das metodologias mais sensíveis e confiáveis nos estudos do papilomavírus humano.

Realizamos nesse estudo o sequenciamento unidirecional nas amostras HPV positivas que não foram possíveis de ser genotipadas através do método de RFLP, dando ênfase principalmente aos produtos amplificados pelo *primer* GP05/GP06, já que através dele foi possível detectar todas as pacientes positivas e não foi possível aplicar o método de RFLP às suas amostras HPV positivas. Usamos o *primer reverse* desse iniciador para o sequenciamento.

Para a padronização inicial do sequenciamento, enviamos para ser sequenciado o produto da PCR purificado da amostra 003, amplificado pelo *primer* GP05/GP06. Esse produto foi selecionado, pois o genótipo viral já havia sido determinado pelo método de RFLP.

Na comparação da sequência da paciente 003 com sequências disponíveis no banco de dados genéticos (NCBI), foi possível alinhar 87 bases com 100% de similaridade ao HPV Tipo 11.

O resultado da padronização do sequenciamento foi condizente com o resultado da digestão com as enzimas de restrição, confirmando que a metodologia de RFLP é confiável para a determinação do tipo viral, assim como o sequenciamento; que a partir de então foi aplicado nas amostras ainda não genotipadas.

Entre as seis meninas HPV positivas para o iniciador GP05/GP06, foram sequenciadas quatro amostras: 003 (sequenciamento descrito acima), 020, 025 e 030.

No alinhamento do sequenciamento dessas amostras obtivemos: paciente 020 que apresentou 99% de similaridade com HPV Tipo 42; amostra 025 que apresentou 100% de similaridade com HPV Tipo 11; e paciente 030 que apresentou 100% de similaridade com HPV Tipo 11.

A última amostra a ser genotipada foi à paciente 010, a qual o sequenciamento foi realizado com o produto da PCR do *primer* MY09/MY11, produto esse que não foi possível determinar o tipo viral pelo método de RFLP. Para este iniciador, usamos a sequência *forward* para o sequenciamento.

No alinhamento desta amostra com as sequências similares dos genótipos virais do HPV, obtivemos 80% de similaridade com o papilomavírus humano tipo 38.

Portanto, através do sequenciamento conseguimos identificar os genótipos virais das amostras ainda não tipadas e relatamos que os tipos do HPV detectados através da metodologia descrita são todos classificados como de baixo risco para o desenvolvimento de câncer.

4.3.3 Análise Total dos Resultados HPV Positivos

Com os resultados obtidos, selecionamos as amostras que foram positivas para o papilomavírus humano e descrevemos as informações mais relevantes a respeito de cada uma dessas pacientes.

Na tabela 7 relacionamos as pacientes positivas e a informação epidemiológica estatisticamente significativa. Além dos dados dos iniciadores e sua capacidade de detecção viral, além da metodologia usada para a identificação de cada genótipo viral e o tipo do HPV que infectou cada menina.

Tabela 7: Análise das pacientes HPV positivas do estudo

	PACIENTES HPV POSITIVAS					
Registro	001	003	010	020	025	030
Idade (anos)	9	5	9	6	9	4
Condiloma/Local	+/ vulva	+/vulva	-	+/vulva e períneo	-	-
<i>Primer</i> MY09/MY11	+	+	+	-	+	-
<i>Primer</i> GP05/GP06	+	+	+	+	+	+
RFLP/ Tipo HPV	+/6	+/11	-	-	+/11	-
Sequenciamento/ Tipo HPV	*	+/11	+/38	+/ 42	+/ 11	+/ 11

+ (positivo ou presente); - (negativo ou ausente);

* tipagem da amostra apenas por RFLP

Na figura 9 relacionamos os genótipos virais identificados em nosso estudo e suas respectivas frequências. Os tipos virais determinados são considerados de baixo risco carcinogênico, sendo responsáveis principalmente pelo desenvolvimento de lesões benignas nas pacientes.

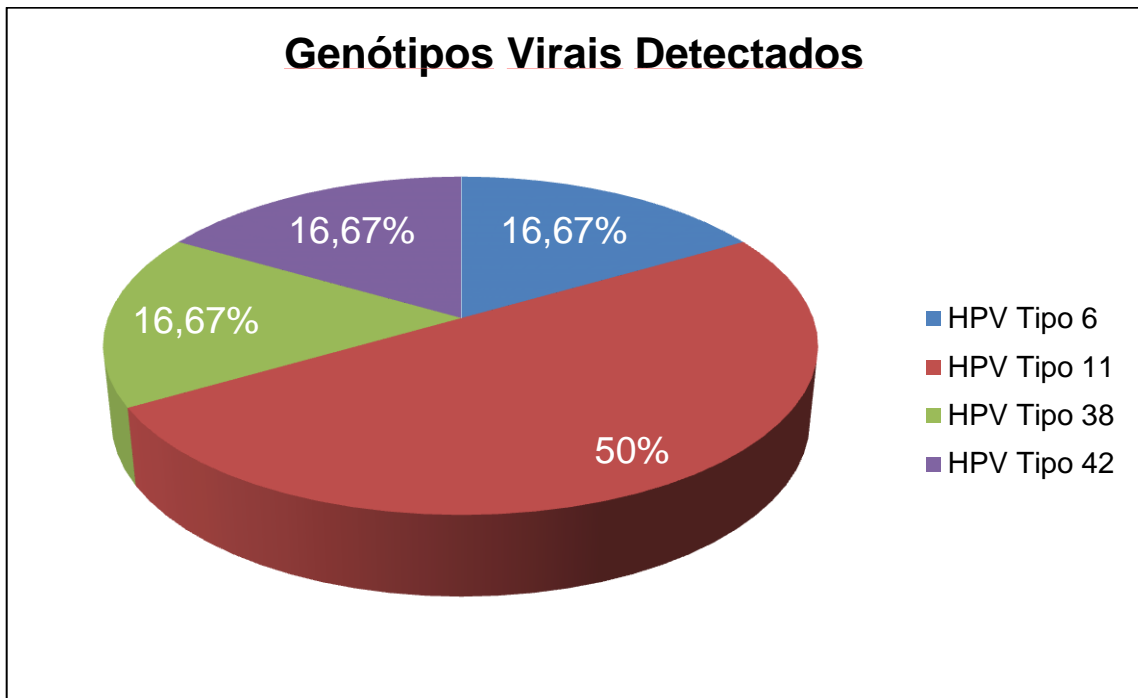


Figura 9: Percentuais dos genótipos do Papilomavírus Humano identificados nas amostras positivas.

Para todos os responsáveis pelas pacientes foi entregue um laudo (anexo 4) sobre a análise da respectiva amostra, que consistia do resultado da detecção do HPV e tipagem viral, quando realizada. Nos casos dos indivíduos HPV positivo, o responsável legal juntamente com a menina afetada, foram convocados a retornar ao ambulatório de ginecologia Infante Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória para uma nova consulta; onde foram informados da presença do vírus, do grau de agressividade do HPV, as providências necessárias para o tratamento e a necessidade do acompanhamento médico de 6 em 6 meses.

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado no Espírito Santo direcionado para a detecção e identificação através da análise molecular do papilomavírus humano em amostras de meninas na faixa etária até nove anos; correlacionado com as possíveis vias de transmissão viral que afetam este grupo não favorecido por métodos de proteção.

São poucos os dados disponíveis na literatura referente a este grupo de risco, dificultando uma comparação direta com resultados atuais referentes a estas meninas.

Pelo fato de não conhecermos se esta parcela da população faz parte de um grupo de risco para o HPV, juntamente com a observação de um crescente número de meninas carentes que procuram o sistema único de saúde (SUS) com verrugas vulvovaginoperineal; surgiu a iniciativa do desenvolvimento deste estudo.

Apesar das limitações do número amostral, os resultados obtidos de genotipagem positiva apontam para uma necessidade de mais pesquisas referentes a este grupo de risco, até então não reconhecido no estado do Espírito Santo.

5.1 CORRELAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO COM O MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL

Na análise das 43 pacientes femininas incluídas no estudo, o papilomavírus humano esteve presente em 13,9%. As amostras foram coletadas principalmente da região da vulva, períneo e anal; submetidas à extração do DNA viral e em seguida ao método de detecção do HPV.

Grande parte dos trabalhos publicados relacionados à frequência do HPV em meninas são direcionados a região oral, sendo poucos os dados referentes à região genital. Entre os poucos estudos disponíveis, podemos citar Rintana et al., que em 2005 detectaram HPV em 4 a 15% de amostras genitais e em 12 a 21% de amostra oral obtidas de meninas até 3 anos de idade.

Em uma pesquisa similar realizado em 2009 por Castellsagué et al., o DNA do HPV foi detectado em 9,2% e 9,0% nas regiões orais e genitais de recém-nascidos do sexo feminino, respectivamente.

Apesar do pequeno número amostral obtido neste estudo, a frequência do HPV encontrada para o grupo de meninas até nove anos de idade em nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura (Rintana et al., 2005 e Castellsangué et al., 2009) que também compararam a presença do HPV genital em meninas.

Em um estudo realizado em Londres, por Rice et al. (2000), foi aplicada a metodologia de PCR na detecção do HPV em 48% de amostras bucais de crianças na idade entre 3 a 11 anos, resultando em alta sensibilidade da técnica. Nossos resultados convergiram com os dados acima; que através do uso de metodologia semelhante, conseguimos detectar o DNA do HPV com grande especificidade e sensibilidade nas amostras positivas.

Geralmente, os métodos de diagnóstico para a infecção por HPV baseados na PCR utilizam os iniciadores *consensus* e degenerados por proporcionar melhores resultados na detecção viral (Chang et al., 1995; Shah et al., 1997; Gravitt et al., 1998). Neste estudo optamos pela utilização de *primers* que não fossem específicos para determinados tipos virais, mas que fossem capazes de detectar um grande número de genótipos do HPV em uma única reação da PCR.

Os pares de *primers* MY09/MY11 e GP05/GP06 são amplamente usados principalmente por amplificar uma região altamente conservada do gene L1 de todos os genótipos do HPV; porém a sensibilidade de cada um esta relacionada à eficiência de amplificação do DNA alvo variar de um genótipo do HPV para outro, com discordância nos padrões de amplificação, como observada em nossos resultados.

O iniciador MY09/MY11, que amplifica fragmento de ≈ 450 pb, foi capaz de detectar quatro das seis (66,67%) amostras HPV positivas; enquanto que o *primer* GP05/GP06, que origina produto da PCR de ≈ 140 pb, foi sensível o suficiente para detectar as seis (100%) pacientes positivas encontradas no estudo.

A explicação para essa diferença de sensibilidade foi proposta por Baay et al. em 1996, que encontraram uma correlação entre a eficácia da PCR e o tamanho do produto originado, demonstrando uma maior eficiência na amplificação de produtos pequenos.

Esta informação nos possibilita concluir que a razão para essa diferença de sensibilidade observada em nosso trabalho está relacionada ao pequeno tamanho do produto de PCR produzido pelo iniciador *consensus* e pelo fato dele não conter bases degeneradas, concordando com Baay et al. (1996).

Os estudos atuais utilizam o *primer* GP, na detecção do HPV, como iniciador interno do *primer* MY em uma *nested* PCR; pelo fato de aumentar a sensibilidade do estudo. Evander et al. (1992) compararam os resultados obtidos com os *primers* MY e GP independentes e a *nested* de MY/GP; e observou que os iniciadores isolados foram capazes de detectar DNA do HPV em 5,6% das amostras com citologia cervical normal e 26,3% nas amostras alteradas, porém houve um aumento na eficiência dos resultados quando aplicaram a *nested* PCR, 19,2% e 84,2% , respectivamente.

No entanto, nossos resultados vêm contestar a pesquisa descrita acima, demonstrado que é possível ter resultados confiáveis e de alta eficiência usando os *primers* independentemente, evitando, dessa forma, o grande risco de contaminação originada pelas reações de *nested* PCR.

Sugerimos que não haja escolha de apenas um par de *primer*, pois a prevalência da infecção por HPV pode ser subestimada; sendo a melhor opção, portanto, a associação dos dois conjuntos de iniciadores para aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica.

5.2 DEFINIÇÃO DOS GENÓTIPOS VIRAIS NAS AMOSTRAS HPV POSITIVAS

A detecção do DNA do HPV pela técnica de PCR é importante, mas é fundamental discriminar o tipo viral presente nos materiais provenientes principalmente das mucosas genitais, a fim de verificar se os genótipos presentes são de alto ou baixo potencial para o desenvolvimento de neoplasias cervicais (Bernard et al., 1994; Villa, 2000).

Após a determinação da presença do papilomavírus humano nas pacientes analisadas, os seis casos HPV positivos foram submetidos a métodos de identificação do genótipo viral.

O método de RFLP foi aplicado a este trabalho nos produtos amplificados pelos iniciadores MY09/MY11, sendo possível identificar aproximadamente 40 tipos de HPV provenientes das mucosas genitais, baseando-se na tabela descrita por Bernard et al. (1994).

Neste estudo, entre as quatro amostras positivas, segundo o *primer* degenerado, foi possível identificar o genótipo viral em três, resultando em uma sensibilidade da metodologia de 75%.

Kaneshina et al. (2001) alcançaram uma sensibilidade de 100% na genotipagem de amostras de infecções cervicais de pacientes atendidas em um laboratório de microbiologia médica através do método de RFLP utilizando o padrão de corte descrito por Bernard et al. (1994).

A possível razão para esta diferença de sensibilidade entre os dois trabalhos esta relacionada a pouca quantidade de DNA viral encontrada em nossas amostras, além da aplicação de apenas duas enzimas em comparação a sete utilizadas por Kaneshina et al. (2001) para tipagem do HPV.

Então, para complementar nosso estudo, principalmente com os iniciadores GP05/GP06, foi realizado o sequenciamento dos casos HPV positivos que não foram tipados pelo método de RFLP. Foram enviadas cinco amostras para serem sequenciadas, sendo quatro amplificadas pelo iniciador GP05/GP06 e uma pelo iniciador MY09/MY11; e o genótipo viral de todas foram identificados por esse método, resultando em uma sensibilidade de 100%.

O uso do sequenciamento do DNA permite detectar uma ampla variedade de tipos do HPV, maior que a disponível pela digestão enzimática, e reduzir a probabilidade de resultados falsos positivos, devido toda detecção viral ser verificada através do sequenciamento do HPV (Smith et al., 2004). Entretanto, mesmo com a maior sensibilidade alcançada por este método, a técnica de RFLP não deve ser descartada dos estudos do HPV por possibilitar de forma imediata a identificação dos principais tipos virais.

As metodologias acima descritas possibilitaram identificar os genótipos virais frequentes em meninas de uma unidade de saúde do município de Vitória, sendo encontrado o HPV 11 presente em 3 pacientes (50%) e; HPV 6, HPV 38 e HPV 42 encontrado cada um em uma amostra (16,67% cada), respectivamente. Não houveram casos de infecção por múltiplos tipos virais.

Estudos semelhantes realizados na Inglaterra analisaram o papilomavirus humano em 25 amostras de tecido anogenital de crianças. O HPV foi detectado em 22 amostras, sendo o tipo 6 e/ou 11 presente em 20 pacientes, o HPV 18/11 em um indivíduo e uma única amostra infectada por um tipo indefinido (Gibson et al., 1990).

Na Polônia o HPV foi detectado em amostras genitais de 14 das 27 crianças com condiloma acuminado, sendo o HPV 6 presente em 86% das pacientes e o HPV 11 presente em 15% (Obalek et al., 1990). Nos Estados Unidos foram encontrados HPV 6 e HPV 16 em 24% e 19%, respectivamente, de amostra bucal de crianças (Jenison et al., 1990).

Desta mesma forma, no Brasil, um estudo realizado em 11 amostras bucais de recém-nascidos, os tipos virais prevalente foram o HPV 6, 11, 52, 18 e 59 (Rombaldi et al., 2008).

Por conseguinte, como observado, os genótipos virais 6 e 11 são comumente encontrados nos estudos relacionados ao papilomavírus humano, principalmente pelo fato de serem os maiores responsáveis pelo desenvolvimento de verrugas genitais. Contudo os tipos 38 e 42, detectados em nosso estudo, são pouco frequentes, não havendo relatos na literatura da sua correlação com amostras genitais de meninas com idade inferior a 9 anos.

Estes tipos virais identificados neste trabalho são classificados como de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias, condizente com as pesquisas semelhantes e diferentes das análises do papilomavírus humano relacionado à transmissão vertical; onde o HPV de alto risco se torna prevalente.

5.3 AVALIAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E DEFINIÇÃO DAS POSSÍVEIS VIAS DE TRANSMISSÃO VIRAL

Os estudos descritos na literatura relacionados à presença do HPV em meninas e a investigação das possíveis formas de contaminação viral, tem direcionado as averiguações para recém nascidos ou meninas na faixa entre 0 a 11 anos de idade. A média da idade das pacientes incluídas em nosso trabalho foi de 6 anos e 1 mês, com pré requisito de idade entre 0 a 9 anos.

A idade dos casos HPV positivos detectados em nosso estudo foram entre 4 a 9 anos, com média de 7 anos, não havendo diferença significativa na prevalência do HPV em relação a idade das meninas. Rehme et al. (1998) obteve resultado semelhante, também no Brasil, onde a média de idade das meninas com lesões condilomatosas foi de 6 anos e 11 meses. Rice et al. publicaram em 2000 a presença do HPV, sem diferença significativa, em amostra bucal de crianças na faixa etária entre 3 a 11 anos de idade.

De acordo com os dados comparativos de Rehme et al. (1998) e Rice et al. (2000), sugerimos que a infecção viral se estabelece no início da vida e persiste por toda ela. Embora na população adulta a infecção pelo HPV seja considerada quase exclusivamente uma doença sexualmente transmissível, concordamos com Gross (1992) e Armstrong & Handley (1997), que apontam que outros modos de transmissão para crianças podem ocorrer, como transmissão vertical, inoculação digital ou por meio de outras lesões, via fômites.

Não podemos descartar a transmissão do HPV através da atividade sexual em meninas, já que é expressivo a frequência de adolescentes precoces, grávidas. Apesar disso, no nosso trabalho não houve relatos de pacientes que tenha iniciado a vida sexual.

Outra forma de se infectar com o papilomavírus humano por rota sexual é através do abuso; sendo descrito na literatura como o principal responsável pela frequência do HPV em crianças e adolescentes. Em um estudo que avaliou a comparação direta da infecção genital por HPV em meninas abusadas e não abusadas sexualmente, a prevalência do DNA do HPV encontrado foi de 33% nas abusadas em relação a 0% dos controles (Gutman et al., 1992).

Observamos em nossos resultados que a incidência de abuso sexual, no entanto, foi nula, divergindo com a literatura. Entretanto, a ocorrência de abuso sexual deve sempre ser levada em consideração e investigado.

A segunda maior forma de transmissão viral em crianças é a vertical, que ocorre durante a gestação ou no trabalho de parto com a transmissão direta da gestante para o feto. A presença de lesões em crianças com menos de 3 anos de idade sugere este modo de transmissão, vista que o período de latência estimado por alguns autores pode variar de 1 a 3 anos (Rehme et al., 1998).

Estudos atuais relatam casos de recém nascidos HPV positivos discordantes do tipo viral materno ou nascidos de mães HPV negativas (Syrjanen et al., 2000). Smith et al. (2004) estudaram famílias nas quais mães e filhos foram infectados pelo papilomavírus humano, e 5 entre 6 meninas demonstram discordância no tipo viral de suas mães. Rombaldi et al. (2009) também identificaram a infecção viral por HPV em 1% a 20% de recém nascidos de mulheres grávidas que não demonstram nenhuma evidência de infecção cervical pelo vírus.

Em nossa casuística, concordamos com os autores acima, uma vez que não encontramos caso de menina HPV positiva nascida de mãe também infectada; a única gestante positiva para o vírus teve a filha HPV negativa. Isto nos possibilita descartar a hipótese de transmissão vertical, principalmente pelo fato das meninas positivas deste estudo serem mais velhas, com idade superior a 4 anos.

Uma das sugestões da literatura como forma de proteção contra a transmissão viral de parturiente para o feto, é a cesárea (Puranen et al., 1997; Tseng et al., 1998; Xiaoping et al., 1998); porém pesquisas mais atuais discordam destes estudos. Eppel et al. (2000) sugeriram uma possível forma de transmissão transplacentária. E em 2005, Medeiros et al. demonstraram que é possível encontrar recém nascidos HPV positivos com a via de parto cesariana.

Analisando nossos dados, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa referente às meninas HPV positivas nascidas por parto vaginal ou cesárea na aquisição da infecção viral.

Outras formas de contaminação já foram descritas na literatura como prováveis. A transmissão horizontal foi sugerida no estudo realizado por Rice et al (2000) devido a possibilidade de detectar o DNA do HPV na mucosa de 1 a 11 (9%) crianças de 6 meses de idade previamente HPV negativas, nascidas de mães também negativas para o vírus. Possivelmente a transferência do vírus pode ter ocorrido por familiares ou pessoas contaminadas que tiveram contato com a criança.

Nas meninas positivas do nosso estudo, não conseguimos detectar, através da entrevista, membros da família infectados por HPV, porém este modo de transmissão não pode ser descartado, uma vez que a omissão ou a falta de conhecimento sobre a contaminação por HPV pode ter ocorrido por parte dos entrevistados. Também não é possível descartar a possibilidade de ocorrência do abuso sexual sem a perda da virgindade.

Podemos caracterizar como fômites: objetos hospitalares contaminados, toalhas, calcinhas, sabonete e qualquer outro material que possa ter entrado em contato anteriormente com vírus; sendo todos possíveis responsáveis pela transmissão do vírus principalmente para meninas.

Observamos durante entrevista com os responsáveis legais pelas pacientes, a alta frequência da troca desses objetos íntimos (calcinhas, toalhas) numa mesma família, entre parentes e até mesmo na escola; não havendo a preocupação da separação dos materiais. Informações características principalmente da população analisada, carentes e sem recursos financeiros, tornando-se um grupo de risco ainda maior.

A contaminação viral de nossas meninas por fômites pode ser considerada como possível forma de transmissão do vírus. Pao et al. (1993) sugeriram esse tipo de transmissão como possível, uma vez que encontraram DNA do HPV em swab da vulva através da PCR em 14,8% de mulheres virgens.

Desta forma, sugerimos que a transmissão horizontal, particularmente as vias de transmissão do HPV por fômites sejam as principais vias de contaminação viral para as meninas abaixo de nove anos no ambulatório de ginecologia Infanto Puberal do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória.

Outro aspecto importante e estatisticamente significativo para esta pesquisa é a presença de verrugas genitais nas meninas analisadas. O local mais comum do aparecimento do condiloma acuminado neste grupo é a região do períneo, podendo se estender até o canal anal (Frasier, 1994). Encontramos na nossa população, que o local predominante foi à vulva e/ou períneo; porém não foram em todas as pacientes positivas que nos deparamos com a presença de lesões condilomatosas.

De acordo com a literatura, a detecção do DNA do HPV não necessariamente significa que o paciente tem ou teve verruga. A infecção pode ser subclínica ou latente, e isto permanece incerto em relação ao tempo desta assintomática lesão viral na paciente. Neste caso, a célula hospedeira é normal e existe um DNA viral episossomal nas células basais, em oposição a presença da verruga, onde o vírus e as proteínas virais estão na camada granular (Powell et al., 2003).

As verrugas genitais estavam presentes em três das seis pacientes HPV positivas (50%); sendo as outras três meninas com infecção subclínica.

É importante que se dê enfoque para os nossos resultados, uma vez que as meninas podem estar infectadas pelo vírus sem lesões clínicas, e devido a isso não haja preocupação por parte dos responsáveis legais em relação à evolução do quadro e tratamento.

5.4 SUGESTÕES DE TRATAMENTOS E FUTURAS FORMAS DE PREVENÇÃO PARA ESTE GRUPO DE RISCO

A resolução espontânea pode ocorrer, de acordo com dados da literatura, embora seja uma forma de evolução ocasional (Kraus & Stone, 1990).

As meninas diagnosticadas positivas para o papilomavírus humano sem lesão aparente devem ter acompanhamento médico com frequência (máximo seis em seis meses) para a detecção e tratamento inicial quando ocorrer o desenvolvimento da verruga.

O tratamento ideal do condiloma em meninas deveria ser de baixo custo, efetivo, atraumático e amplamente acessível e infelizmente ainda não é possível. Os métodos utilizados são a destruição química ou mecânica das lesões, as quais apresentam o inconveniente de serem dolorosos e deixarem cicatrizes.

Ainda, a melhor opção é prevenir para que estas meninas não sejam contaminadas pelo vírus. Porém, as vacinas preventivas estão disponíveis apenas para uma parcela da população mundial, de 9 a 26 anos, estando disponível no Brasil apenas na rede particular de saúde com custo muito elevado.

Em nossa opinião, a solução para este grupo de risco é a autorização por parte do gestor de saúde a liberação da vacina quadrivalente contra o HPV para esta população e a sua adição ao Calendário Básico de Vacinação da Criança, devendo ser ministrada antes dos seis meses de vida.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatamos que ainda são poucos os estudos realizados em meninas com idade abaixo de nove anos; porém verificamos que a apesar do pequeno número amostral,

a frequência do HPV detectado em nossa pesquisa é condizente com a literatura, principalmente em relação à população e o tipo de amostra estudada.

A prevalência dos tipos do papilomavírus humano de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias, assim como a identificação de genótipos pouco descritos nas pesquisas (HPV 38 e HPV 42), caracteriza esta parcela da população do Espírito Santo.

Sugerimos que a transmissão horizontal e por fômites são as formas de contaminação do HPV que atingem o grupo de meninas atendidas em uma unidade de saúde do município de Vitória

Deste modo, as informações apuradas por este estudo sugerem que meninas abaixo de nove anos de idade estão sob risco de se contaminarem com HPV e, portanto devem ser consideradas como possíveis contempladas à vacinação contra este vírus.

São necessárias investigações futuras no sentido de: possibilitar a identificação de um maior número de genótipos virais através da adição de novas enzimas ao método de RFLP e conseqüentemente aumentar a sensibilidade da técnica; definir a melhor opção para disponibilizar a metodologia de detecção e tipagem do HPV para o sistema único de saúde (SUS); ampliar o número de amostras, a fim de abranger todo o estado do Espírito Santo, sem a distinção de classe econômica, demonstrando aos órgãos de saúde a necessidade do desenvolvimento de políticas públicas preventivas para esse grupo de risco.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo observacional onde analisamos a incidência de HPV em um grupo de meninas, observamos:

- Incidência de 13,9% do papilomavírus humano em meninas com idade até nove anos atendidas em uma unidade de saúde do município de Vitória;
- A reação em cadeia da polimerase foi específica na detecção do DNA viral, sendo a maior sensibilidade obtida pelo *primer* GP05/GP06 (100%) em comparação ao *primer* MY09/MY11 (66,67%);
- Os tipos virais 6, 11, 38 e 42 foram os identificados na população estudada, sendo classificados como de baixo risco para o desenvolvimento de neoplasias;
- A metodologia de RFLP mostrou menor sensibilidade (75%) na determinação do genótipo viral e baixa capacidade de identificação de tipos virais menos frequentes quando comparada ao sequenciamento, que foi altamente sensível (100%).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armstrong DK, Handley JM. Anogenital warts in pre-pubertal children: pathogenesis, HPV typing and management. *Int J STD AIDS*. 1997; 8: 78-81.

Baay MFD, Quint WGV, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MPM, Stolz E, Herbrink P. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 745-747.

Barcerlos MRB. Prevalência de DST, padrão de comportamento e aspectos relacionados à saúde reprodutiva das mulheres atendidas em unidade básica de saúde em Vitória, ES. Dissertação de mestrado. 2005

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J. Infect. Dis.* 1994; v. 170, p.1077-1085.

Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer*. 2006; 118: 1071-1076

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401: 70-79.

Bistoletti P, Lidbrink P. Sexually transmitted diseases including genital papillomavirus infection in male sexual partners of women treated for cervical intraepithelial neoplasia III by conization. *Brs J Obstet Gynecol* 1988; 95: 611-3.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995; 87: 796-902.

Bosch FX, Qiao YL, Castellsagué X. Chapter 2: The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Inst J Gynecol Obstet*. 2006; 94 (1): S8-S21.

Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, Ali MM, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noel A, Englert Y, Fontaine V. Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migrations and invasion of trophoblastic cells. *Carcinogenesis*. 2010; 31 (3): 473-480.

Burchell AN, Winer RL, De Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006; 24s3: s3/52-s3/62.

Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, et al. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol*. 1995; 47: 209-18.

Cason J, Mant CA. High-risk mucosal human papillomavirus infections during infancy & childhood. *Journal of Clinical Virology*. 2005; S52-S58.

Cason J, Rice P, Best JM. Transmission of cervical cancer-associated human papilloma viruses from mother to child. *Intervirology*. 1998; 41: 213-218.

Castellsagué X, Drudis T, Cañadas MP, et al. Human papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes: a prospective study in Spain. *BMC Infectious Diseases*. 2009; 9: 74-86.

Centurioni MG, Puppo A, Merlo DF, Pasciuccio G, Cusimano ER, Sirito E, et al. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infect Dis*. 2005; 5: 77.

Chand DY, Hsieh CY, Chen RJ, Lee SC, Huang SC. Comparison of detection of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma tissues by Southern blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol*. 1995; v. 43, p. 430-435.

Clertant P, Seif I. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*. 1984; 311 (5983): 276-279.

Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJF, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the international agency for research on cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005; 366 (9490): 991-9.

Copulsky J, Whitehead ED, Orkin LA. Condyloma acuminata in a three-year-old boy. *Urology*. 1975; 5: 372-373.

Della Torre G, Donghi R, Longoni A, Pilloti S, Pasquini G, de Palo G, Pierotti MA, Rilke F, Della Porta G. HPV DNA in intraepithelial neoplasia and carcinoma of the vulva and penis. *Diagn Mol Pathol*. 1992; 1: 25-30.

De Carvalho N, Teixeira J, Roteli-Martins CM, et al. Sustained efficacy and immunogenicity of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine up to 7.3 years in young adult women. *Vaccine*. 2010; 28: 6247-55

de Lima Soares V, de Mesquita AM, Cavalcante FG, et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health*. 2003; 8(7): 595-603.

De Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group (Review). *J Virol*. 1989; 63: 4898-4903.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, et al. Specific interaction between HPV – 16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991; 35: 2824-2827.

Eppel W, Word C, Frigo P, Ulm M, Kucera E, Czerwenka K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. *Obstet Gynecol*. 2000; 96: 337-41.

Evander M, Edlund K, Bodén E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G. Comparison of a one-step and two-step polymerase chain reaction with

degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 987-992.

Favre M, Breitbart F, Croissant O, et al. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol.* 1975;. 15: 1239-1247.

Ferenczy A. External anogenital warts: old and new therapies. *J SOGC.* 1999; 1305-1313

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide.* IARC CancerBase. 2004; N.5, version 2.9. IARC Press.

Frasier LD. Human papillomavirus infections in children. *Pediatr Ann.* 1994; 23: 354 – 60.

Gal SA. Female genital warts: global trends and treatments. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2001; 9: 149-54.

Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa (Review). *Am J Dermatopathol.* 1991; 13: 386-395.

Gibson PE, Gardner SD, Best SJ. Human papillomavirus types in anogenital warts of children. *Journal of Medical Virology.* 1990; 30 (2): 142-145.

Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microbiol.* 1998; v. 36, p. 3020-3027.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *Introdução a genética,* In: *Genética e diferenciação celular.* Guanabara Koogan. 1998; 6ed: 682-708

Gross G. Condylomata acuminata in childhood – pointing to sexual abuse. *Hautarzt.* 1992; 43:120-5.

Gutman LT, St Claire K, Herman-Giddens ME, Johnston WW, Phelps WC. Evaluation of sexually abused and nonabused young girls for intravaginal human papillomavirus infection. *Am J Dts Child.* 1992; 146: 694-699.

Hausen H, Villiers EM. Human Papillomaviruses. (review). *Ann Rev Microbiol.* 1994; 48:427-447.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller, JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 1989; 8: 3905-3910.

Hung CF, Monie A, Alvarez RD, Wu TC. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. *Experimental and Molecular Medicine.* 2007; 39 (6): 679-689.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). HPV – Perguntas e Respostas Frequentes. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em jan. 2010.

- Jenison SA, Yu X, Valentine JM, Koutsky LA, Christiansen AE, Beckmann AM, Gallaway DA. Evidence of Prevalence Genital Type Human Papillomavirus Infection in Adults and Children. *Journal of Infectious Diseases*. 1990; 162 (1): 60-69.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarfoth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000; 355: 2189-93.
- Kraus SJ, Stone KM. Management of genital infection caused by human papillomavirus. *Rev Infect Dis*. 1990; 12 (Suppl 6): S620-32.
- Kousty L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *The American Journal of Medicine*. 1997; 102 (5A): 3-8.
- Kumar B, Gupta R, Sharma SC. Penile condylomata acuminata in a male child: a case report. *Genitourin Med*. 1990; 66:226-228
- Lambert PF, Spalholz BA, Howley PM. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxyterminal domain with the E2 transactivator. *Cell*. 1987; 50: 69-78.
- Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ, Dotto GP, Dimaio D. Tumorigenic transformation of mouse keratinocytes by the E5 genes of human papillomavirus type 16 bovine papillomavirus type 1. *J Virol*. 1991; 65: 7078-7083.
- Lewin B. Genes VII, In: *Oncogenes e cancer*. Artmed Editora. 2000; 837-873.
- Lima BMC, Golub JE, Mattos AT, Freitas LB, Spano LC, Miranda AEB. Human papillomavirus in women with and without HIV-1 infection attending an STI clinic in Vitoria, Brazil. *Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care*. 2009; 8: 286-290.
- Lopes F, Latorre MR, Campos Pignatari AC, Buchalla CM. HIV, HPV, and syphilis prevalence in a women's penitentiary in the city of Sao Paulo, 1997-1988. *Cad Saude Publica*. 2001; 17(6): 1473-80.
- Lothaire P, Azambuja E, Dequanter D, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck*. 2006; 28 (3): 256-69.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AI, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells*. 1989; 7: 209-2144.
- Medeiros LR, Ethur ABM, Hilgert JB, Zanini RR, Bozzetti MC, Mylius LC. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad. Saúde Pública*. 2005; 21 (4): 1006-1015.
- Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, et al. Efficacy of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review. *Int J Gynecol Cancer*. 2009; 19: 1166-76.

Minkoff H, Chervenak FA. Elective primary cesarean delivery. *N Engl J Med.* 2003; 348: 946-50.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer.* 2010; 10: 550-560.

Munoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, et al. Impact of human papillomavirus (HPV) – 6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102: 325-39.

Nicolau SM. Diagnóstico da infecção genital por papilomavírus humano: relação entre a peniscopia e a histopatologia das lesões acetobranças da genitália masculina. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1997.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prolla JC, Bozzetti MC. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. *Rev Saúde Pública.* 2002; 36 (1): 95-100.

Obalek S, Jablonska S, Favre M, Walczak L, Orth G. Condylomata acuminata in children: frequent association with human papillomaviruses responsible for cutaneous warts. *Journal of the American academy of dermatology.* 1990; 23 (2): 205-213.

Oliveira LHS, Rosa MLG, Pereira CRN, et al. Human papillomavirus status and cervical abnormalities in women from public and private health care in Rio de Janeiro state, Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 2006; 48(5): 279-85

Oriel JD. Sexually transmitted diseases in children: human papillomavirus infection. *Genitourin Med.* 1992; 68: 80-83.

Partridge JM, Koutsky LA. Genital Human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6(1): 21-31.

Pao C, Tsai P, Chand Y, et al. Possible non-sexual transmission of genital human papillomavirus infections in young women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993; 12: 221-3.

Pereyra EAG, Parellada CI. HPV nas mulheres. HPV na prática clínica. 2005; 02.

Pfister H, Fuchs PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. (Review). *Intervirology.* 1994; 37: 143-149.

Pinotti JA, Ricci MD. Panorama do HPV no Brasil e no Mercosul. HPV na Prática Clínica. 2005; 19.

Powel J, Strauss S, Gray J, Wojnarowska F. Genital carriage of human papilloma virus (HPV) DNA in prepubertal girls with and without vulval disease. *Pediatric Dermatology.* 2003; 20 (3): 191-194.

Puranen M, Yliskoski MH, Saarikoski SV, Syrjanen KJ, Syrjanen SM. Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176: 1039-45.

Queiroz DT, Pessoa SM, Sousa RA. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV): incertezas e desafios. *Acta Paul Enferm.* 2005; 18 (2): 190-6.

Rapaport D. *Biologia do HPV. HPV na Prática Clínica.* 2005; 2.

Rehme MFB, Carvalho NS, Ihlenfeld MFK, Chuery ACS. Condiloma acuminado em crianças e adolescents. *RBGO.* 1998; 20(7): 377-380.

Resnick RM, Cornelissen MTE, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, ter Schegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 1477-1484.

Rice PS, Cason J, Best JM, Banatvala JE. High risk genital papillomavirus infections are spread vertically. *Reviews in Medical Virology.* 1999; 9:15-21.

Rice SP, Mant C, Cason J, Bible JM, Muir P, Kell B, Best JM. High Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 Infection Among Children. *Journal of Medical Virology.* 2000; 61:70-75.

Rintana M, Grenman S, Jarvenkyla ME, Syrjanen kJ, Syrjanen SM. High-risk types of papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: 1728-33.

Roberts S, Ashmole I, Hohanson GD, Kreider JW, Gallimore PH. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 1993; 197: 176-187.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virology Journal.* 2009; 6: 83.

Sandal T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *The Oncologist.* 2002; 7: 73-81.

Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15(5): 727-46.

Schiffman MH. Validation of HPV hybridization assays: correlation of filter in situ, dot blot and PCR with Southern blot. In *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* Publication no.119, Munoz, N., Bosch, F.X. Shah, K.V. & Meheus. A. International Agency for Research on Cancer: Lyon. 1992; 169-179.

Schmidt MT, Olejnik AK, Gozdicka-Jósefiak. The HPV16 E2 transcriptional regulator mode of action depends on the physical state of the viral genome. *Acta Biochim Polon.* 2005; 52: 823-832.

- Schneider A, Meinhardt G, de Villiers EM, Gissmann L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV DNA hybridization studies. *Diagn Cytopathol.* 1987; 3: 250-5
- Sicherol L, Boccardo E, Villa LL. Métodos diagnósticos baseados em biologia molecular. HPV na prática clínica. 2005; 06.
- Silva AMTC, Amaral MVT, Cruz AD. HPV e Cancer – O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2002; 29: 48-54.
- Shah KV, Solomon L, Daniel R, Cohn S, Vlahov D. Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 1997; v. 35, p. 517-519.
- Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Swarnavel S, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Human Papillomavirus Prevalence and Types in Newborns and Parents. *Sexually Transmitted Diseases.* 2004; 31 (1): 57 – 62.
- Snijders PJ, Van den Brule AJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. (Review) *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994; 186: 177-198.
- Snijders PJF, Van den Brule AJF, Schrijnemakers HJF, Snow G, Meijer CJLM, Walboomers JMM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 173-181.
- Spalholz BA, Yang Y-C, Howley PM. Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell*1985; 43: 183-191.
- Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpeviruses as possible cofactors in HPV-16 related oncogenesis. *Acta Biochimica Polonica.* 2009; 56(2): 337-342.
- Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biology.* 1999; 9: 379-386.
- Syrjanen S. HPV infection in children: *Papillomavirus Report.* 2003; 14: 93-110.
- Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potencial role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11(2): 259-274
- Tjiong MY, Out TA, Ter Schegget J, Burger MP, Van Der Vange N. Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract; a review. *Int J Gynecol Cancer.* 2001; 111(8): 726-7.
- Torre GL, Waune C, Chiaradia G, Mannocci A, Ricciardi W. HPV vaccine efficacy in preventing persistent cervical HPV infection: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine.* 2007, 25: 8352-8358.

Trottier H, Franco EI. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006; 24(Suppl 1): S4-S15.

Tseng C, Liang C, Soong Y, Pao C. Perinatal transmission of human papillomavirus infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol*. 1998; 91:92-6.

Villa LL. *Biologia Molecular: Conceitos e Princípios Básicos*. In: *Conhecendo o HPV Patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF*. Frôntis Editorial. 2000; cap. 20, p.137-143.

Vogel F, Motulsky AG. *Genética humana: problemas e abordagens*, In: *Mutação: mutação somática, câncer e envelhecimento*. Guanabara Koogan. 2000; 3ed: 355-376

Vousden K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB Journal*. 1993; 7:872-879

Xiaoping W, Qingyi Z, Huiling R. Maternal-fetal transmission of human papillomavirus. *Chin Med J*. 1998; 11:726-7.

Wheeler CM, Kjaer SK, Sigurdsson K, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6,11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in sexually active women aged 16-26 years. *J Infect Dis*. 2009; 199: 936-44.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248: 76-79.

World Health Organization. *Human papillomavirus infection and cervical cancer*. 2004.

World Health Organization. *Human papillomavirus infection and cervical cancer*. 2007.

Wright CA, Taylor L, Cooper K. HPV typing of vulvovaginal condylomata in children. *S Afr Med J*. 1995; 85 (10 suppl): 1096-101

Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Amplification and typing of multiple cervical cancer-associated human papillomavirus DNAs using a single pair of primers. *Int. J. Cancer*. 1990; 45: 990-992.

Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas (Review). *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977; 78: 1-30.

ANEXOS

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 09 de dezembro de 2010.

Da: Profa. Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde


Para: Prof. (a) Lúri Drumond Louro
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Detecção molecular do papilomavírus humano em crianças contaminadas por diferentes rotas de transmissão”**.

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. **205/10** intitulado: **“Detecção molecular do papilomavírus humano em crianças contaminadas por diferentes rotas de transmissão”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 08 de dezembro de 2010.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


Prof.^a Dra Ethel Leonor Noia Maciel
COORDENADORA
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Ciências da Saúde/UFES

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7504

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

I – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Título: “*Detecção Molecular do Papilomavírus Humano em crianças contaminadas por diferentes rotas de transmissão*”

Pesquisadores Responsáveis: Dr. Antônio Chambô Filho – médico ginecologista e obstetra do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória e professor da EMESCAM. Dr. Lúri Drumond Louro – professor da UFES, Dept°. de Ciências Biológicas.

II - INFORMAÇÕES PARA CONTATO:

Núcleo de Genética Humana e Molecular, Av. Marechal Campos 1468, Vitória- ES. Telefone: (027) 3335-7493.

Descrição da Pesquisa:

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é a infecção mais comum transmitida sexualmente entre adultos e adolescentes, caracterizado como causador de verrugas genitais e câncer cervical. Atualmente, a pluralidade do HPV é estabelecida, sendo mais de 120 tipos identificados e classificados em HPV de alto risco e HPV de baixo risco. O vírus é encontrado em adultos e adolescentes sexualmente ativos, porém muitos estudos confirmam sua presença em crianças que não sofreram abuso sexual. Os modos de transmissão para a criança ainda não são totalmente definidos, mas sabe-se que é possível contrair o vírus por transmissão vertical (pais para o filho), transmissão horizontal (familiares ou pessoas contaminadas que permanecem em contato com a criança), abuso sexual, auto-inoculação (de locais infectados para outros não infectados) e através de fômites (instrumentos contaminados).

Através da análise molecular (Reação em Cadeia da Polimerase – PCR-, RFLP e Seqüenciamento) é possível detectar a presença do Papiloma Vírus Humano e determinar o subtipo presente no paciente. A partir desse ponto, pode ser possível determinar a via de transmissão do vírus com o auxílio de um questionário preenchido pelo sujeito da pesquisa ou responsável legal.

Para participar deste projeto de pesquisa, basta ceder uma amostra da região lesionada ou região considerada suspeita (região bucal, vulva, região perineal, perianal e anal). Desta amostra o DNA será extraído, através da PCR o vírus será detectado; e uma vez detectado, será classificado através da RFLP e de seqüenciamento.

III - RISCOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:

O único desconforto possível é proporcionado pela raspagem dos locais lesionados ou locais considerados suspeitos, além da possibilidade de dor mínima na região do procedimento. Todo material utilizado é descartável e a coleta será feita por um profissional capacitado. Esta pesquisa não trará benefício imediato ao paciente, além da detecção do vírus quando presente e posteriormente, o aconselhamento dos modos de tratamento da infecção.

III- DIREITOS E GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O paciente não é obrigado a participar desta pesquisa. Os indivíduos que quiserem participar têm acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive perguntas em caso de dúvidas. Liberdade do responsável legal de retirar o consentimento do paciente a qualquer momento e a não participação neste projeto de pesquisa não implicará em nenhum prejuízo ao sujeito. Não haverá gastos para os indivíduos que quiserem participar da pesquisa e também não terá nenhum ganho material. A identidade dos participantes não será revelada e a confidencialidade, sigilo e privacidade dos pacientes serão preservados. A amostra do paciente não será armazenada, sendo eliminada como lixo hospitalar sem identificação após a análise dos resultados nesse projeto de pesquisa. Não estão previstas formas de ressarcimento ou indenizações durante a pesquisa.

V - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA:

NOME DO PACIENTE:.....

SEXO: M () F () DATA NASCIMENTO:/...../.....

NOME DO RESPONSÁVEL:

SEXO: M () F () DATA NASCIMENTO:/...../..... PARENTESCO.....

TELEFONE:()..... CEL: ().....

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Local e data

Assinatura do participante ou responsável

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO 3 – Avaliação Epidemiológica

AVALIAÇÃO DOS CASOS SUSPEITOS DE HPV

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE:

SEXO: M F DATA DE NASCIMETO:...../...../.....

TELEFONE: ()..... CEL: ().....

TIPO DE PARTO:DURAÇÃO:.....

JÁ TEVE RELAÇÕES SEXUAIS: QUANTOS ANOS:

SOFREU ABUSO SEXUAL: QUANTOS ANOS:

PRESENÇA DE VERRUGAS GENITAIS:

QUAL LOCAL: HÁ QUANTO TEMPO:

PRESENÇA DE VERRUGAS NO TRATO ORAL:

HPV DETECTADO: QUAL TIPO:

PRESENÇA DE ALGUÉM NA FAMÍLIA COM HPV:

QUANTIDADE DE IRMÃOS:

II. DADOS DOS PAIS DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DA MÃE:

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:

ENDEREÇO:

TELEFONE: ()..... CEL: ()..... TRAB. ().....

NÍVEL DE ESCOLARIDADE:

ESTADO CONJUGAL:

NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAL:

NÚMERO DE FILHOS:

PRESENÇA HPV NOS FILHOS:

HISTÓRICO DE IMUNODEPRESSÃO (HIV):

PRESENÇA HPV: QUAL TIPO:

PRESENÇA DE VERRUGAS GENITAIS:

QUAL LOCAL:..... HÁ QUANTO TEMPO:

HPV OU VERRUGAS GENITAIS DURANTE A GESTAÇÃO:

QUAL TIPO: QUAL LOCAL:

NOME DO PAI:
 DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE:
 ENDEREÇO:
 TELEFONE: ()..... CEL: ()..... TRAB. ().....
 NÍVEL DE ESCOLARIDADE:
 ESTADO CONJUGAL:
 NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAL:
 NÚMERO DE FILHOS:
 PRESENÇA HPV NOS FILHOS:
 HISTÓRICO DE IMUNODEPRESSÃO (HIV):
 PRESENÇA HPV: QUAL TIPO:
 PRESENÇA DE VERRUGAS GENITAIS:
 QUAL LOCAL:..... HÁ QUANTO TEMPO:

III. DADOS DO RESPONSÁVEL PELO SUJEITO DA PESQUISA*

***responsável que mantém contato com o sujeito**

NOME DO RESPONSÁVEL:
 DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE:
 ENDEREÇO:
 TELEFONE: ()..... CEL: ()..... TRAB. ().....
 NÍVEL DE ESCOLARIDADE:
 PARENTESCO COM O SUJEITO:
 TIPO DE RELAÇÃO COM O SUJEITO:
 FREQUÊNCIA POR DIA COM O SUJEITO:
 QUAIS OS CUIDADOS COM O SUJEITO:
 ESTADO CONJUGAL:
 NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAL:
 PRESENÇA HPV: QUAL TIPO:
 PRESENÇA DE VERRUGAS GENITAIS:
 QUAL LOCAL: HÁ QUANTO TEMPO:
 NÚMERO DE FILHOS:
 CONTATO COM ALGUÉM QUE POSSUE HPV:

ANEXO 4 – Laudo

NGHM
Núcleo de Genética Humana e Molecular
Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, DATA

Exame: Detecção e determinação do subtipo de Papiloma Vírus Humano (HPV)

Paciente:

Procedência: Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE HPV

Descrição da Técnica: Através da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é possível amplificar a região L1 do Papiloma Vírus Humano, e detectá-lo quando presente na amostra. Caso positivo, através da reação de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é possível determinar o subtipo do vírus e classificá-los de acordo com o padrão em alto ou baixo risco. A visualização do DNA amplificado e dos fragmentos de RFLP é através de eletroforese em gel de acrilamida corado com nitrato de prata.

RESULTADO: _____ para HPV, Tipo viral: (alto/baixo risco).

Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

CRM-ES 7350

Mariana Penha De Nadai Sartori

Bióloga, Mestranda (Biotecnologia)

