



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO GARCIA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO HPV**

SÃO CARLOS
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRUNO GARCIA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO HPV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Euclides Matheucci Jr.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira

SÃO CARLOS

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R672d Rocha, Bruno Garcia
Desenvolvimento de metodologias para identificação
molecular do HPV / Bruno Garcia Rocha. -- São Carlos
: UFSCar, 2016.
104 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Papilomavírus humano. 2. HPV. 3. PCR em tempo
real. 4. Sequenciamento Sanger. 5. Sequenciamento de
nova geração. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Bruno Garcia Rocha, realizada em 31/03/2016:

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior
UFSCar

Profa. Dra. Lucimara Aparecida Forato
Embrapa

Profa. Dra. Anamaria Alves Napoleão
UFSCar

Profa. Dra. Ana Carla Oliveira da Silva
UNESP

Prof. Dr. Cleber Ferraresi
HMS

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família por estarem sempre ao meu lado,
pelos ensinamentos, pelo amor me dado e exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sempre me guiar, minha vida, me dando tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimando com as dificuldades que ocorreram no caminho.

Aos meus pais, Eurico e Maria, meu irmão Richard que me deram todo o suporte em meus estudos e sempre incentivaram, me apoiaram em todos os momentos e me mostraram o quanto é importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade que tive. Sem eles eu não teria alcançado este sonho.

Ao meu orientador Euclides Matheucci Junior e ao Marcos Antônio de Oliveira pela orientação, apoio, puxões de orelhas, ensinamentos, tanto pessoais como profissionais e sem dúvida nossa grande amizade durante o período.

A minha futura esposa Patrícia, com quem eu sei que passarei todo o resto da minha vida, vivendo muitos momentos de felicidades como esta. Obrigado pela sua compreensão, pelo amor, ajuda e conversas em todos os momentos.

Agradeço a empresa DNA Consult Genética e Biotecnologia - São Carlos pelo apoio na realização desta pesquisa, disponibilizando o local, equipamentos e reagentes.

Aos meus amigos(as) de DNA Consult/QGene – São Carlos, que ajudaram direta e indiretamente neste trabalho, Jussara, Carla, Juliana, Camila, Nadine, Adriana e Fabio.

Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz por ceder as amostras para realização deste trabalho em especial a Dra. Sonia, Dra. Daniela, Dra. Neuza e toda a equipe do instituto.

Obrigado aos amigos do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Fernanda, Milena, Cleber, George e Evandro tanto de mestrado quanto de doutorado. Aos professores do programa, que me ajudaram nesta caminhada. À secretária Claudia, sempre prestativa em todos os momentos ajudando no que era possível.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste doutorado.

E agradeço a todos meus amigos que me viram lutando para entrar no mestrado e no doutorado, acompanhando minhas conquistas, alegrias e tristezas neste período sempre me puxando para cima quando necessário.

Aos amigos do grupo de jovens Brasa – São Carlos, aos Fitinhas, aos Genômicos, aos PokerMigos, aos Moleques de Quarta-feira e todos que direta e indiretamente contribuíram para este trabalho.

*Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo,
Mas é necessário ter pessoas para transformar seus sonhos em realidade.*

Walt Disney

RESUMO

O Papilomavírus humano conhecido como HPV é uma doença sexualmente transmissível frequente em todo mundo, ele infecta o epitélio de seres humanos, podendo persistir de forma assintomática ou causar neoplasias. Diversos estudos relatam a associação entre o HPV (Alto Risco) e diversos tipos de câncer como: colo de útero, ânus, orofaringe, pênis, vagina e vulva. Segundo dados do INCA para o ano de 2016, são esperados 16.340 novos casos de câncer de colo de útero, sendo de maior frequência na população feminina no Brasil. Para a identificação do vírus existem inúmeros métodos de rastreamento como testes morfológicos (exame do Papanicolau), que observam os efeitos citopáticos que o vírus provoca nas células sugerindo a existência da infecção, mas este tipo de teste apresenta baixa especificidade e vem apresentando altas taxas de falsos-negativos e positivos. Para contornar estes problemas inúmeros estudos têm demonstrando a eficácia da utilização de técnicas moleculares, para aumentar a sensibilidade e especificidade, conseguindo identificar e genotipar o vírus do HPV. No presente estudo foram testadas diferentes técnicas moleculares para a identificação do vírus do HPV como: PCR convencional seguida por sequenciamento Sanger, PCR em tempo real (SYBRGreen® e Taqman®) e sequenciamento de nova geração. Ao todo foram coletadas 318 de amostras de raspado do colo cervical. Deste material foi extraído o DNA utilizando um protocolo adaptado (POWELL, GANNON, 2002). Utilizando a técnica da PCR convencional seguida por sequenciamento Sanger obtivemos 65 amostras positivas para o HPV (21%), destas 49 amostras (75,3%) foi possível identificar o tipo do HPV e em 16 casos (24,7%) não foi possível identificar o vírus, sendo possivelmente uma infecção formada por dois ou mais tipos do vírus. Com a técnica de PCR em tempo real utilizando SYBRGreen® foi realizado um experimento com 30 amostras sendo possível confirma o resultado destas com o sequenciamento Sanger em 28 casos. Em duas amostras os resultados não corroboraram, sendo possível positivar a amostra. Mostrando a maior sensibilidade da técnica de PCR em tempo real. A metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS) se mostrou útil para identificação do HPV, demonstrada neste trabalho de maneira inédita. O uso do NGS apresenta boas perspectivas pois além do HPV pode identificar outros microrganismos na amostra e quantificá-los.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano, HPV, PCR em Tempo Real, Sequenciamento Sanger, Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

The Human Papiloma Virus (HPV) is a Sexually Transmitted Disease (STD) very common in the world. It infects the human epithelium may persisting of asymptomatic form or causing some neoplasia. Many studies report the association between HPV and many kinds of cancer such as: lap utero, anus, penis, vagina and vulva. According to INCA data for the year of 2016 are expected 16.340 new cases of lap utero cancer, being the second most frequent case in the female population in Brazil. For the recognition of the virus, there`s a lots of tracking methods, as morphological test (pap test), that observes cytopathic effects caused by the virus on human cells, suggesting the existence of infection, however this type of test presents low results and has shown high taxes of false negative and positive results. To overcome this problems, countless studies has shown the effect of molecular techniques utilization to increase the sensibility and especially, getting recognize and genotyping the HPV virus. On this recent studies, were tested distinct molecular techniques for typing the HPV virus, as Conventional PCR followed by Sanger Sequencing , Real time PCR (SYBRGreen® e Taqman®) and Sequencing of New Generation. Altogether were collected 318 samples pf cervix grated, and from this material were collected the DNA using an adapted protocol (POWELL; GANNON, 2002). Using the conventional PCR technique followed by Sanger Sequencing we obtained 65 positives samples for the HPV(21%), in 49 samples(75,3%) it was possible to identify the HPV type, in the other 16 samples(24,7%) it was not possible the identification, probably because the infection was formed for two or more types of the virus. With the real time PCR technique using SYBRGreen®, were accomplished an experimete with 30 samples, which was possible to confirm the results in 28 of it, using Sanger Sequencing. In two samples the results are not confirmed, being possible to positive the sample, showing high sensibility of the real time PCR technique. The methodology of New Generation Sequencing (NGS) it showed useful for HPV identification, being one of the first studies published for routine use. And it has great prospects because besides HPV can identify other microorganisms in the sample and quantifies them as well.

Keywords: Human Papiloma Virus, HPV, Real Time PCR, Sanger Sequencing, New Generation Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1_ A. Lebre com chifres (“Jacklope”). B. Coelho com infecção de Papilomavírus	18
Figura 2_ Modelo tridimensional do HPV	21
Figura 3_ GENOMA DE HPV 16	24
Figura 4_ Árvore filogenética contendo as sequências de 118 Genótipos de Papilomavírus.	26
Figura 5_ Ciclo celular do HPV	30
Figura 6_ Lesões precursoras do carcinoma.	35
Figura 7_ Teste moleculares e o grau de sensibilidade utilizados no diagnóstico do HPV.	37
Figura 8_ Representação esquemática da técnica de captura híbrida mostrando os principais passos para realização de um exame.	39
Figura 9_ Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR).	41
Figura 10_ Representação esquemática do processo do sequenciamento de DNA pelo método Sanger.	44
Figura 11_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “ <i>Sequencing by Synthesis – Illumina</i> ” – Fragmentação de DNA.	49
Figura 12_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “ <i>Sequencing by Synthesis – Illumina</i> ” – Clusterização.	50
Figura 13_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “ <i>Sequencing by Synthesis – Illumina</i> ” - Sequenciamento por síntese.	51
Figura 14_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “ <i>Sequencing by Synthesis – Illumina</i> ” – Leitura e Captação de dados.	52
Figura 15_ Kit de coleta citológico contendo escova endocervical e tubo com meio líquido.	55
Figura 16_ Eletroforese em gel de agarose.	69
Figura 17_ Eletroferograma parcial da sequência de DNA obtida do <i>Amplicon</i> de 450pb (MY09/MY11) analisado pelo software Chromas 2.4 (Technelysium©) gerado pelo sequenciador automático capilar MegaBace1000 (Ge HeathCare).	71
Figura 18_ Exemplo do resultado da busca por similaridade utilizando o software BLAST do NCBI.	72
Figura 19_ Relatório gerado pelo software Pathseq- Virone para identificação do vírus do HPV.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1_ Funções das proteínas expressas da região precoce do HPV.	23
Tabela 2_ Classificação dos principais genótipos de HPV de acordo com o seu risco oncogênico.	27
Tabela 3_ Comparação entre as diferentes classificações utilizadas em exames citológicos.	33
Tabela 4_ Grupos analisados na técnica da captura híbrida	38
Tabela 5_ Sequências do oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR do gene da β -Globina e da região L1 do HPV (MY09/MY11).	58
Tabela 6_ Sequências dos oligonucleotídeos e <i>probes</i> utilizados para amplificação por PCR em tempo real para os HPV genótipo 16, 18 31 e a β -Globina.	62
Tabela 7_ Resultados obtidos para identificação do vírus do HPV.	65
Tabela 8_ Protocolos utilizados para extração do DNA de raspados de colo cervical com as variáveis testadas.	68
Tabela 9_ Resultado obtido utilizando PCR em tempo real	74
Tabela 10_ Parâmetros obtidos nos sequenciamentos utilizando <i>Miseq</i> Reagente Kit v2, 300 cycle (2x150pb).	77
Tabela 11_ Trabalhos publicados envolvendo a detecção do HPV através da metodologia de PCR utilizando os <i>primers</i> MY09/11.	83
Tabela 12_ Comparação dos números de amostras positivas e negativas utilizando o PCR convencional e a PCR em tempo real.	84
Tabela 13_ Resumo das metodologias moleculares utilizadas neste trabalho com suas vantagens e desvantagens.	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1_ Proporção de casos positivos e negativos na população estudada.....	70
Gráfico 2_ Distribuição dos genótipos encontrados.....	73
Gráfico 3_ Proporção dos genótipos de alto, baixo risco oncogênico e risco indeterminado.....	73
Gráfico 4_ PCR em tempo real com a química SYBR Green® para identificação do vírus do HPV utilizando os primer MY09/MY11.....	75
Gráfico 5_ Diagnóstico molecular de HPV utilizando a metodologia de PCR em tempo real (<i>Taqman</i> ®).....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA** – Agência Nacional De Vigilância Sanitária
- BLAST** – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*
- BPV** – do inglês *Bovine Paillomavírus*
- CCD** – do inglês *Charge-Couplet device*
- CH** – Captura Híbrida
- Ct** - do inglês *Cycle Threshold*
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA** do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- FDA** do inglês *Food and Drug Administration*
- HPV** – do inglês *Human Papillomavírus*
- HR** do inglês *High Risk*
- ICTV** – Comité Internacional de Taxonomia de Vírus
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer - José Alencar Gomes da Silva
- kb** kilobase
- kD** – kiloDalton
- LR**- do inglês *Low Rick*
- LRC** do inglês *Long Control Region*
- mRNA** – RNA mensageiro
- NCBI** do inglês *National Center for Biotechnology Information*
- NGS/SNG** - do inglês *Next-Generation Sequencing*
- NIC** – Neoplasia Intraepitelial Cervical
- ORF** do inglês *Open Reading Frame*
- P/A**- Para Análise
- pb** – pares de base
- PCR** – do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- PCR-RT/qPCR** do inglês *Real Time PCR*
- PGH** – Projeto do Genoma Humano

PRNT – Poder Relativo de Neutralização Total

PV – Papiloma Vírus

Rb - Retinoblastoma

RLU - do inglês *Relative Luminescence Units*

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotações por Minutos

SDS - do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

TAE – Tampão Tris-Acetato- EDTA

Taq – do inglês *Thermus aquaticus*

TE – Tris-EDTA

Tm - do inglês *Melting Temperature*

TRIS – do inglês *Hydroxymethyl*

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Histórico do HPV	18
1.2. Estrutura Viral e Organização do Genoma	20
1.3. Taxonomia e Classificação dos HPVs	24
1.4. Ciclo Biológico do HPV	28
1.5. Diagnostico do HPV	30
1.5.1. Técnicas Morfológicas	31
1.5.1.1. Citologia ou Teste de Papanicolau	31
1.5.1.2. Histopatologia:	34
1.5.2. Testes Moleculares	35
1.5.2.1. Captura Híbrida 1 e 2 (CH)	37
1.5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	40
1.5.2.3. Sequenciamento Direto	42
1.5.2.4. PCR em tempo real (Real time PCR)	45
1.5.2.5. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	46
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivos gerais	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. METODOLOGIA	54
3.1. Comissão de ética	54
3.2. Coleta das amostras	54
3.3. Extração do DNA	55
3.3.1. Protocolo de extração de DNA utilizando o kit comercial QIAamp® DNA Blood Mini Kit	55
3.3.2. Protocolo adaptado de extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)	56
3.3.3. Quantificação do DNA extraído	57
3.3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – MY09/MY11	58
3.3.5. Reação de Sequenciamento para genotipagem do HPV	59
3.3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR – Real time) – Utilizando a química SYBR-Green®	60

3.3.8. Genotipagem do vírus utilizando sequenciador de nova geração – Miseq Illumina	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pelo sequenciamento Sanger.....	69
4.2. PCR em tempo real (Real Time PCR)	74
4.2.1. SYBR Green®	74
4.2.2. Taqman®.....	75
4.3. Genotipagem do vírus utilizando sequenciador de nova geração – Miseq Illumina®	76
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE.....	100
ANEXO	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico do HPV

O termo condiloma deriva da palavra grega *Kondiloma* que significa tumor redondo e é causado em sua maioria pelo Papilomavírus Humano (HPV). Sua origem é anterior à existência dos seres humanos modernos, muitas observações de verrugas na antiga Grécia e Roma descrevem condilomas em algumas regiões sobre a pele e órgãos genitais. A doença foi muito associada à práticas homossexuais e a comportamentos promíscuos como descrito em escritos médicos (BÄFVERSTEDT, 1967).

Manifestações de Papilomavírus também tem sido descritas em animais, em documentos, pinturas e alguns mitos foram associados particularmente ao “Jacklope” ou “lebrilope” que é um animal mítico do folclore americano que seria o cruzamento de uma lebre com o antílope. Este animal nunca existiu, provavelmente foram identificados de forma errônea sendo na verdade uma infecção por algum genótipo de Papilomavírus havendo o crescimento do condiloma em coelhos (DE VILLIERS et al., 2004). Estes registros históricos e mitos folclóricos fornecem uma ideia sobre a antiguidade do Papilomavírus e as doenças que eles causam como mostra a figura 1.

Figura 1_ A. Lebre com chifres (“Jacklope”). B. Coelho com infecção de Papilomavírus



Fonte: Adaptado de Hoefnagel, 1580; Mural Animal, 2016.

Legenda: A: Pintura de Joris Hoefnagel por volta de 1575 mostrando uma lebre com chifres (“Jacklope”). B Coelho com infecção por Papilomavírus.

Em 1842, o médico italiano Dr. Rigoni-Stern foi um dos primeiros pesquisadores que levantaram a hipótese de que o Papilomavírus estaria ligado ao câncer de colo do útero. Ele analisou a frequência de casos de câncer cervical muito maior em mulheres casadas e prostitutas do que em freiras e virgens, o que indicou algum agente causador fosse transmitido sexualmente (BURNS, 1992).

Algum tempo mais tarde, em 1891 o médico londrino Joseph F. Payne publicou um artigo registrando a natureza infecciosa das verrugas. Em sua pesquisa ele auto-inoculou uma verruga em seu polegar, depois de ter raspado a superfície de uma lesão de uma criança (BURNS, 1992).

No início do século XX o patologista americano Francis Peyton Rous - prêmio Nobel de medicina 1966 em estudos sobre câncer em animais - demonstrou que um extrato filtrado de células tumorais, isolado do tecido de uma galinha foi capaz de produzir tumores em outra galinha, identificando o primeiro vírus oncogênico, sarcoma de Rous. Anos mais tarde, Rous e Richard Shope identificaram o primeiro Papiloma Vírus (*Shope*), que podia ser transmitido de coelhos selvagens (*Cottontail rabbits*) para coelhos domésticos, por meio de filtrados livre de células. Com isso eles demonstraram que o Papilomavírus de Shope apresentava um potencial neoplásico em coelhos domésticos, como mostrado na figura 1 (SHOPE; HURST, 1933; ROUS; BEARD, 1935).

O advento da microscopia eletrônica, em 1931 pelo físico alemão Ernst Ruska, e do cultivo celular nos anos de 1940 e 1950 possibilitaram grandes avanços no cultivo e identificação do vírus. No final da década de 40, Maurice Strauss e sua equipe usaram o microscópio eletrônico para observar fragmentos retirados de uma verruga. Um ano mais tarde Maurice identificou o Papilomavírus Humano como agente etiológico das verrugas (GARFIELD, 1988).

Até os anos noventa já se sabia que os Papilomavírus eram carcinogênicos em coelhos e eram capazes de modificar alguns tipos de células em roedores, porém, não havia uma relação entre os Papilomavírus e o carcinoma cervical humano (ZUR HAUSEN, 1994).

No início de 1980, o médico alemão Harald Zur Hausen publicou os primeiros trabalhos sobre hibridização molecular, utilizando sondas de RNA derivadas de verrugas plantares, posteriormente esta técnica foi aperfeiçoada pelo bioquímico inglês Edwin Southern (*Southern Blot*) utilizando sondas de DNA, e, com isso

possibilitando a distinção de vários genótipos de HPV existentes, de acordo com a sequência do DNA (DE VILLIERS et al., 2004; HUBBARD, 2003).

Ainda na década de 1980 Zur Hausen e colaboradores isolaram o DNA do Papilomavírus humano a partir de verrugas genitais e de papilomas na laringe. O DNA do vírus presente na laringe mostrava ser similar ao DNA presente no câncer de colo uterino. O descobrimento levou ao isolamento do HPV 16 no material colhido por biopsia em 50% dos casos de câncer de colo uterino. Mais tarde, o grupo isolou o DNA do HPV 18 em outros 20% dos cânceres de colo uterino. Com as descobertas de que diferentes genótipos do HPV contribuem para a formação de tumores oncogênicos, foram reforçadas as pesquisas na área com a crescente importância médica (DOORBAR, 2006). Desta forma, ficou comprovada a relação entre a presença do HPV e o câncer do colo uterino.

O câncer de colo do útero ocupa o terceiro lugar entre os tipos de cânceres mais prevalentes, que afetam mulheres em todo o mundo e é o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres nos países em desenvolvimento, como por exemplo Brasil, Índia e México. As mulheres nestes países respondem a quase 85% das incidências globais de câncer de colo do útero. Já em países desenvolvidos o câncer de colo uterino aparece na décima posição entre os tipos de cânceres que afetam mulheres. Esta grande diferença é devida, em parte, pelo fato dos países desenvolvidos possuírem programas de saúde pública que utilizam métodos de diagnóstico precoces que reduzem o risco de câncer de colo do útero associado à infecção por HPV (JEMAL; BRAY; FERLAY, 1999).

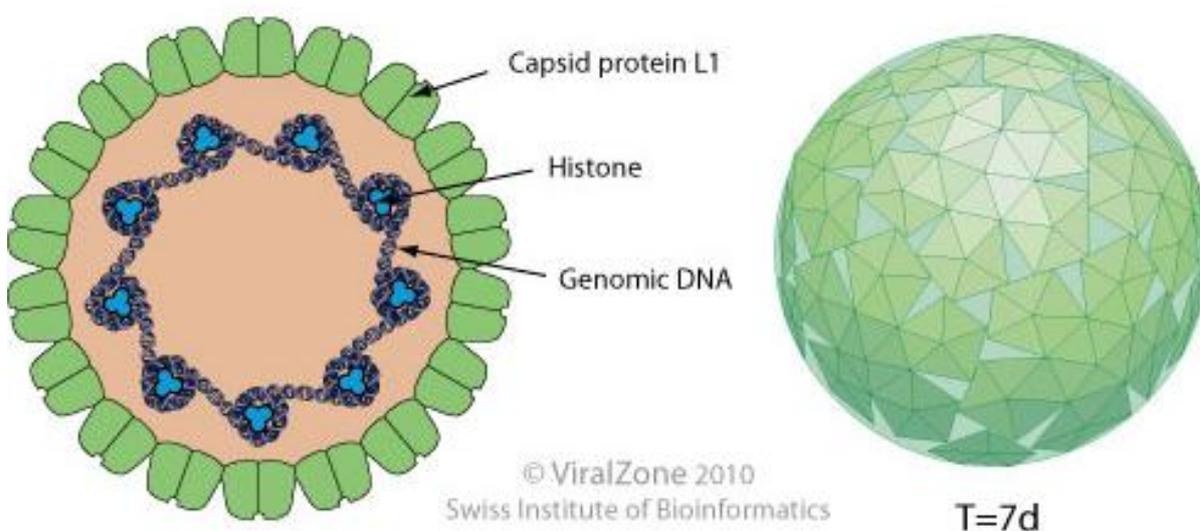
1.2. Estrutura Viral e Organização do Genoma

Os Papilomavírus (PV) são um grupo de vírus encontrados em diversas espécies de mamíferos, aves e répteis, mas devido à sua importância médica os Papilomavírus Humanos (HPV) são os mais estudados. Os HPVs são vírus não envelopados - não lipídicos, que medem entre 50-60nm de diâmetro e seu capsídeo é formado por 72 capsômeros dispostos em forma icosaédrica. Os capsômeros, localizados em cada um dos 12 vértices, são pentavalentes, isto é, circundados por cinco capsômeros adjacentes e os outros 60 capsômeros são hexavalentes (BAKER et al., 1991; ZUR HAUSEN, 1996).

O capsídeo é formado por duas proteínas estruturais: a proteína de capsídeo maior (L1), de 54kD que representa 80% da proteína total viral e a proteína menor (L2) de massa molar de 76kD (E.JUNIOR, 2010). As duas proteínas, L1 e L2, são codificadas pelo genoma do vírus (RAPAPORT, 2016). Abaixo é apresentada uma representação esquemática da imagem tridimensional do HPV.

Figura 2_ Modelo tridimensional do HPV

VIRION



Fonte: (VIRALZONE, 2010)

Legenda: Modelo tridimensional do HPV. Empacotamento dos capsômeros na superfície viral.

Seu genoma é formado por uma única molécula de DNA, circular de fita dupla com aproximadamente 8000pb associados às histonas celulares H2a, H2b, H3 e H4 (ZUR HAUSEN, 1996). A estrutura e a função do genoma do HPV são conservadas em todas as famílias do *Papillomaviridae* e podem ser divididas em região codificadora e não codificadora. As regiões codificadoras são denominadas ORF do inglês *Open Reading Frames* e são divididas em:

1. A região de transcrição precoce E, do inglês *early region*, com cerca de 4kb, que codifica as proteínas – E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – que são responsáveis pela transcrição, replicação viral e controle do ciclo celular na célula hospedeira. As ORFs E3 e E8 foram identificadas, mas elas não são uniformemente distribuídas na família do *Papillomaviridae* e podem ser encontradas, por exemplo, nos BPVs (do inglês *Bovine papillomavirus*)

(DOORBAR, 2006). A tabela 1 mostra as funções de diferentes tipos de proteínas na região precoce do HPV (SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005; BRENTJENS et al., 2002);

2. A região de transcrição tardia (do inglês *late*) com aproximadamente 3kb, codifica as duas proteínas do capsídeo L1 e L2 e é altamente conservada em todos os Papilomavírus (BERNARD et al., 1994);

3. A região não codificante – LCR (do inglês *Long Control Region* ou *upstream regulatory region*, URR), com 1kb, contém a origem da replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição virais (BOOY et al., 1998).

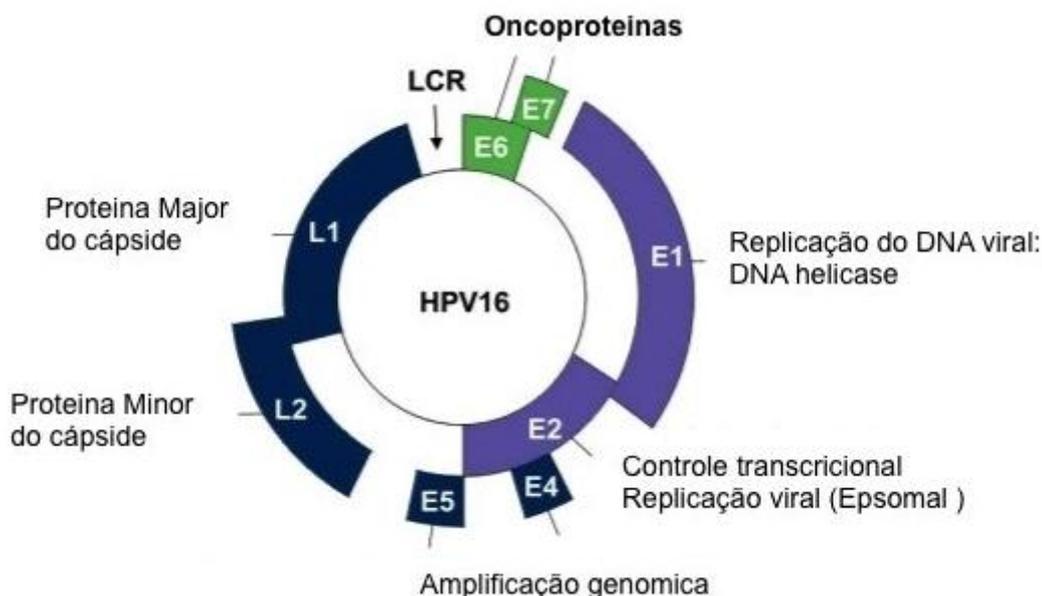
Tabela 1_Funções das proteínas expressas da região precoce do HPV.

Nomes das proteínas	Funções das proteínas
E1	<ul style="list-style-type: none"> • Codifica proteínas para a manutenção do genoma viral; • Importante na indução da replicação viral.
E2	<ul style="list-style-type: none"> • Juntamente com a E1, induz à replicação viral; • Tem efeitos positivos e negativos na transcrição viral; • Importante na prevenção da transformação oncogênica em células contendo o DNA viral.
E4	<ul style="list-style-type: none"> • Associada a colapso da rede de citoqueratina celular, provavelmente auxiliando na saída do vírus da célula. É o que promove o característico aspecto de coilocitose nas células infectadas pelo HPV; • Possível papel na regulação e estabilidade do <i>RNAm</i> - Não parece ser necessária para a transformação oncogênica.
E5	<ul style="list-style-type: none"> • De maneira independente, pode causar transformação tumorigênica, provavelmente associada à modificação das vias de fatores de crescimento. Parece ativar os receptores para o fator de crescimento da epiderme, resultando em estímulo do crescimento celular; • Em associação à proteína E7, pode promover a malignização das linhagens celulares afetadas. Pode inibir a expressão do gene supressor de tumor p21.
E6 e E7	<ul style="list-style-type: none"> • O potencial oncogênico dos genótipos de HPV de alto risco está relacionado às proteínas E6 e E7; • Inibem a função de proteínas supressoras de tumores celulares humanas, como p53 e Rb (retinoblastoma); • Juntas, promovem uma regulação negativa (<i>down regulation</i>) de genes que expressam interferon, limitando a resposta imune do hospedeiro à infecção.

FONTE: SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORHYZ, 2005; BRENTJENS et al., 2002.

A figura 3 mostra uma representação esquemática do genoma do HPV16 com as funções de cada gene na região codificadora (precoce e tardia) e não codificadora (LRC).

FIGURA 3_ GENOMA DE HPV 16



Fonte: Adaptado de D'abramo, 2011.

Legenda: Representação da organização do genoma de um HPV 16 de alto risco e as suas principais funções.

1.3. Taxonomia e Classificação dos HPVs

Embora os primeiros tipos de Papilomavírus tenham sido isolados na década de 1980, houve uma grande dificuldade para encontrar sistemas de cultura celular apropriados para o cultivo e a propagação destes vírus, impedindo com isso, os estudos de suas funções virais e limitando o estabelecimento de uma classificação com base nas propriedades biológicas (DE VILLIERS et al., 2004).

Os primeiros trabalhos sobre taxonomia dos Papilomavírus foram realizados pela técnica de *Southern Blot*: coletando amostras de pacientes que apresentavam verrugas ou lesões epiteliais; em seguida o DNA das lesões foi extraído e submetido à clivagem por enzimas de restrição, seguido por eletroforese e de hibridização com sondas específicas. Desta forma, utilizando a técnica de *Southern Blot* foi possível identificar os diferentes padrões de banda e com isso, classificar diferentes genótipos do HPV (ORTH et al., 1978; COGGIN e ZUR HAUSEN, 1979).

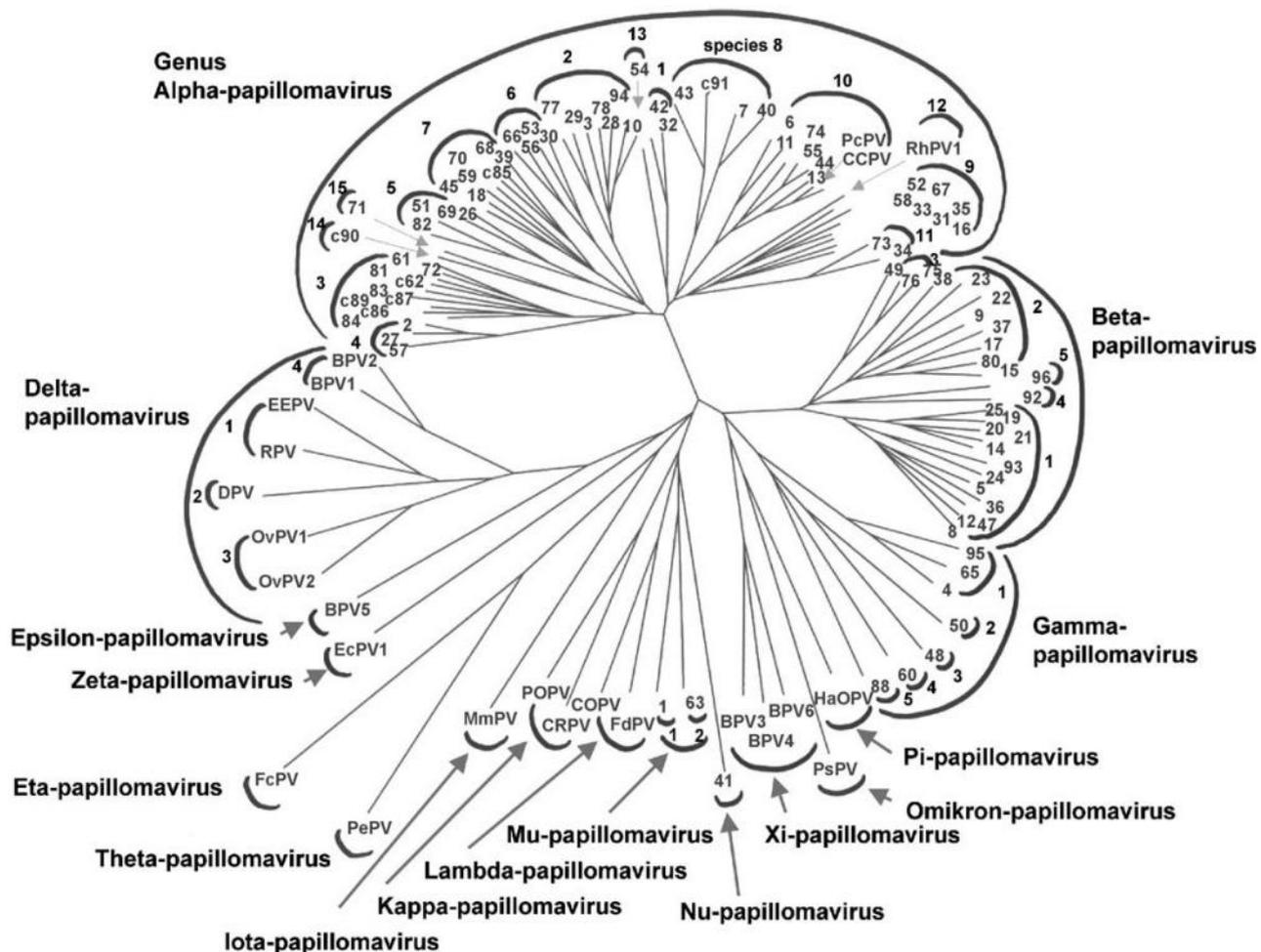
Atualmente foram identificados aproximadamente 120 tipos diferentes de HPVs, sendo classificados como genótipos, onde cada um recebe um número em ordem numérica pela sua descoberta (DE VILLIERS et al., 2004). A classificação em sorotipos não é aplicada aos HPVs, o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) que permitiria a distinção entre os sorotipos do vírus não pode ser realizado devido à dificuldade de cultivar o HPVs. Por este motivo a classificação é feita pela a sequência do DNA e são denominados genótipos e não sorotipos (WHITE, 2007).

A classificação taxonômica do HPV é baseada na comparação das sequências do DNA e da homologia do gene L1, que é a mais conservada entre os diferentes tipos virais. Além da classificação usual em família, gêneros e espécies os Papilomavírus são classificados em tipos, subtipos e variantes. Para classificar um novo genótipo do HPV é necessário isolar o DNA do vírus, clonar o seu genoma e sequenciar o gene L1. Caso ele diferencie mais que 10% da sua sequência de um Papilomavírus conhecido ele é classificado com um novo genótipo. Quando esta diferença for menor entre 10% a 2% ele é classificado em subtipo, abaixo de 2% fala-se em variante (VECKENSTEDT, 2007; BURK, HARARI, CHEN, 2013).

Segundo o comitê de taxonomia viral – *The International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV, da União Internacional de Associações de Microbiologia, que elabora a nomenclatura e a taxonomia dos vírus, o HPV foi classificado em seu último relatório como sendo pertencente à família *Papillomaviridae* onde se encontra o gênero *Papilomavírus*. Nesse gênero são descritas oitos espécies e entre elas está a espécie *Human papillomavirus* - HPV (VAN REGENMORTEL; MAHY, 2004).

Em 2004 os Papilomavírus Humanos foram classificados em 16 gêneros, sendo sua nomenclatura representada por letras do alfabeto grego, de *alfa* a *Pi*, como é apresentado na figura 4. Em 2009 já haviam sido descritos 29 gêneros e os HPVs de importância médica foram distribuídos em cinco gêneros: *Alpha*, *Beta*, *Gama*, *Mu* e *Nu* (VAN REGENMORTEL; MAHY, 2004).

Figura 4_ Árvore filogenética contendo as sequências de 118 Genótipos de Papilomavírus.



Fonte: Adaptado de de Villiers et al., 2004.

Legenda: Os semicírculos externos identificam os gêneros e os semicírculos internos espécies. Os números externos identificam os tipos do HPV e os internos os genótipos, as abreviações se referem aos genótipos de Papilomavírus que infectam animais.

Além de classificar o HPV pela sua sequência do DNA, os vírus são agrupados de acordo com o tropismo pelo tecido infectado, podendo ser divididos em: cutâneos (que infectam pele) e mucosotrópicos (que infectam as mucosas urogenitais, anais e oro-respiratórias). Todos eles pertencem ao gênero *alfa papilomavírus* e incluem 15 espécies, são classificados de acordo com sua associação clínica ou risco oncogênico, sendo: alto risco, do inglês *High-Risk-HR* ou baixo risco, do inglês *Low-Risk-LR* (WALBOOMERS et al., 1999; SILVA; et al., 2003; SOUTO, BORGIO, 2005; SMITH et al., 2007) como mostra a tabela 2.

Tabela 2_ Classificação dos principais genótipos de HPV de acordo com o seu risco oncogênico.

Risco Oncogênico	Espécies	Genótipo
Alto risco oncogênico	5	51,82
	6	56
	7	18,39,45,59,68
	9	16, 31, 33, 35, 52,58
	11	73
Provavelmente de alto risco oncogênico	5	26
	6	53,66
Baixo Risco oncogênico	1	42
	3	61,72,81, CP6108(cand89)
	7	70
	8	40,43
	10	6,11,44
	13	54
	15	71
	3	83
	2	3,28,29, 78,94
Risco Incerto	4	57
	11	34

Fonte: Adaptado de (DE VILLIERS et al., 2004; MUÑOZ et al., 2006).

1.4. Ciclo Biológico do HPV

Os Papilomavírus humanos (HPV) são espécies específicas que apresentam exclusivamente afinidade por células epiteliais, podendo infectar a camada basal das células da pele, mucosa da boca, garganta, trato respiratório e trato anogenital. (CAVALCANTI, CARESTIATO, 2006).

O ciclo biológico do HPV é bastante complexo e pode ser resumido em três etapas. A primeira é denominada fase de Estabelecimento, onde o vírus do HPV entra nas células através de micro lesões do epitélio acessando as camadas basais das células, que são menos diferenciadas do epitélio escamoso e que ainda apresentam atividade mitótica. Os vírus entram dentro da célula pela interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular, mas a dinâmica da interação do HPV com a superfície celular durante esta fase não é completamente compreendida (HORVATH et al., 2010). Estudos indicam que o sulfato de heparan intermedia a fixação inicial do vírus na célula (LONGWORTH, LAIMINS, 2004) e a proteína alfa-6 integrina como receptor celular para os Papilomavírus entrar na célula (EVANDER et al., 1997).

Depois de entrar na célula, os vírus perdem o capsídeo, expondo seu DNA à maquinaria da célula que realiza a expressão dos seus genes. O genoma do vírus fica na forma circular, não integrando o genoma da célula (forma episomal), onde se reproduzem em sincronia com o DNA da mesma com expressão gênica controlada (CAMARA et al., 2008; DOORBAR, 2006). As primeiras proteínas a serem sintetizadas são E1 e E2 que formam um complexo que atuam no recrutamento de DNA polimerases, proteínas acessórias para mediar a replicação do genoma, obtendo de 20 a 50 cópias (HUBERT, LAIMINS, 2002; LONGWORTH, LAIMINS, 2004)

Quando o vírus do HPV toma conta da célula (estrato basal) inicia-se a segunda etapa ou fase de manutenção. Agora o DNA viral se replica junto com DNA do hospedeiro na proporção de 1:1(23 genomas virais são distribuídos nas células filhas). As proteínas E1 e E2 iniciam a replicação do DNA viral e as E6 e E7 atuam como reguladores do ciclo celular para garantir a replicação a longo prazo (DOORBAR, 2006). A proteína E2 tem um papel regulador, pois tem a capacidade de ativar ou reprimir os promotores virais que regulam a expressão de E6 E7 e E1 (FRAZER, 2009).

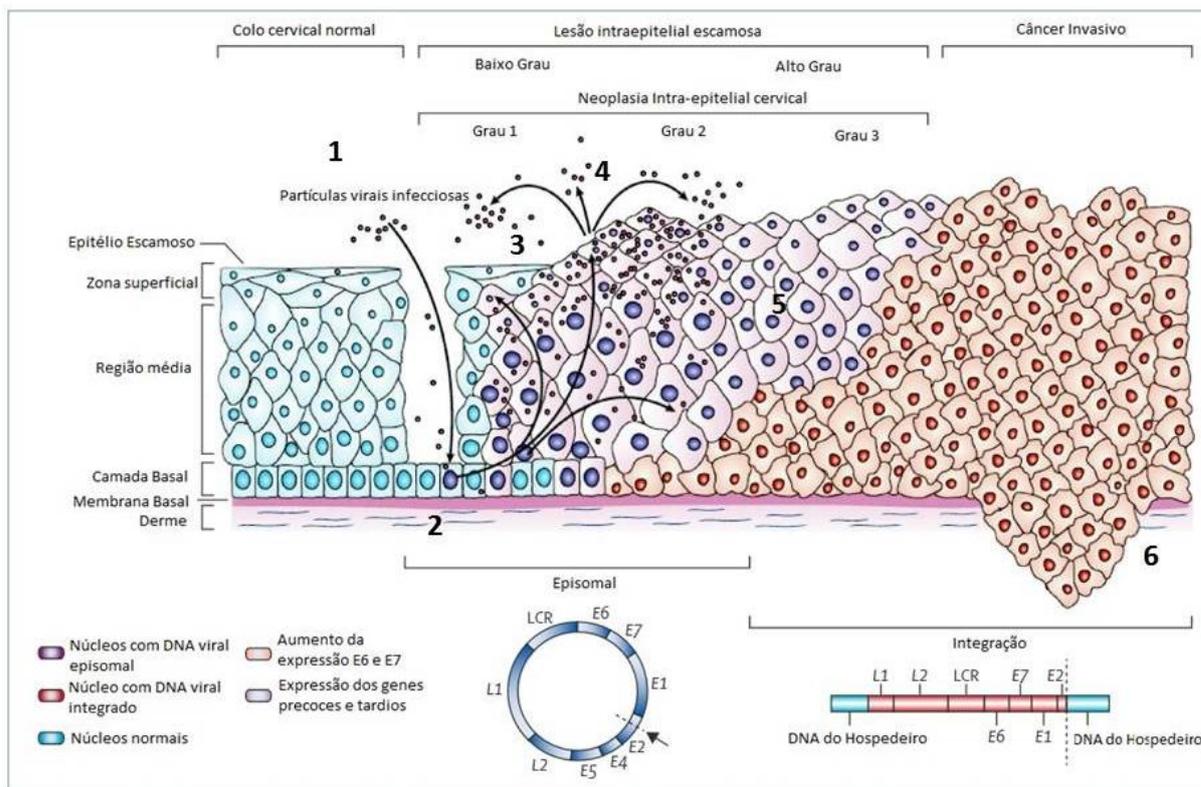
Com o passar do processo, a expressão dos genes E6 e E7 conduzem a transformação das células, que passam a se dividir mais frequentemente apresentando um ciclo de vida mais rápido. No entanto, nos queratinócitos diferenciados da camada supra basal do epitélio, o vírus muda para o modo de replicação do DNA e os genes E1, E2, E5, E6, e E7 contribuem para a manutenção do genoma viral e induzem a proliferação celular, síntese de proteínas do capsídeo e montagem da partícula viral, aumentando o número de células infectadas por HPV no epitélio, dando início à Fase Produtiva (MUÑOZ et al., 2006; HAMID, BROWN, GASTON, 2009)

A última fase se inicia quando as células infectadas pelo HPV começam a deixar a camada basal, sofrendo diferenciação e param de se dividir. Este fornece um sinal ao vírus para ativar seus genes, aumentando os números de cópias do genoma viral. Com isso o controle da expressão das proteínas E6 e E7 é perdida e fica desregulada. Nas camadas superiores do epitélio, todos os genes virais incluindo aqueles que codificam as proteínas L1 e L2, são expressos e milhares de genomas virais são encapsulados e ocorre a saída dos vírus das células. Assim, o vírus começa a infectar novas células (STUBENRAUCH et al., 2000; HUBERT, LAIMINS, 2002; HOU, WU, CHIANG, 2002; BRENTJENS et al., 2002).

A progressão das lesões não tratadas para o câncer invasivo está associada à integração do genoma viral ao genoma humano. Com isso ocorre uma perda ou perturbação do gene E2 que regula a expressão baixa do E6 e E7 até o momento (DEGENHARDT, SILVERSTEIN, 2001; HOU, WU, CHIANG, 2002)

Como consequência os genes E6 e E7 são expressos em níveis muito mais elevados e inativam genes supressores de tumor que atuam em regiões de controle importante do ciclo celular. A proteína E6 se liga à proteína p53 degradando-a, levando a instabilidade genômica e bloqueando a apoptose. A E7 se liga ao produto do gene retinoblastoma (Rb, gene repressor de tumor) e membros de sua família, reativando os mecanismos celulares de replicação do DNA nos queratinócitos para que ocorra a amplificação do genoma viral (FLORES et al., 2000, FRAZER, 2009). A figura 5 demonstra um diagrama com as principais etapas do ciclo biológico do HPV.

Figura 5_ Ciclo celular do HPV



Fonte: Adaptado De Woodman; Collins; Young, 2007.

Legenda: Ilustração mostrando os principais eventos durante o ciclo celular do HPV infectando células basais do epitélio cervical. 1- Entrada de partículas virais até a camada basal. 2- Após a infecção os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7) do HPV começam a ser expressos a partir do DNA episomal (núcleo roxo). 3- Nas camadas superiores - região média e superficial - o genoma viral é replicado rapidamente e os genes tardios são expressos, L1 e L2 encapsulando os genomas virais. 4- Os novos vírus produzidos começam a infectar novas células. 5- Um número desconhecido de células infectadas começam a progredir para neoplasias de alto grau. 6- Progressão das lesões não tratadas levando ao câncer invasivo.

1.5. Diagnóstico do HPV

Medidas voltadas ao diagnóstico precoce da infecção e o tratamento das lesões provocadas pelo HPV, antes de gerar um câncer cervical, são importantes ações de saúde pública para diminuir o número de casos deste tipo de câncer. Portanto é de extrema importância consultar o ginecologista regularmente e realizar exames de prevenção (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2002 e BRINGHENTI, 2010).

Existem inúmeros métodos para o rastreamento do câncer cervical e da infecção pelo HPV. Na prática clínica, são realizados exames citológicos, colposcopia e biópsia cervical. Contudo, estes exames apenas sugerem a existência da infecção

pelo HPV, devido ao seu efeito citopático que são as alterações que o vírus provoca (NAMKOONG, 1995). Portanto, os testes moleculares passam a ser uma ferramenta muito importante para confirmação da infecção pelo HPV e saber qual o seu genótipo.

1.5.1. Técnicas Morfológicas

1.5.1.1. Citologia ou Teste de Papanicolau

Dentre os testes morfológicos, a citologia é o método de rastreamento - *screening* mais utilizado para rastrear câncer cervical e suas lesões pré-cancerosas, NICs, permitindo assim o seu tratamento. Entretanto, a citologia não é o teste mais indicado para detectar a infecção pelo HPV, embora existia uma forte correlação entre as anomalias nas células e a detecção do HPV (CAVALCANTI, CARESTIATO, 2006). Dados mostram que 11% das mulheres com citologia normal apresentam o vírus do HPV em seu organismo, e este valor aumenta para 73% quando os exames citológicos apresentavam alterações celulares (SYRJÄNEN et al., 2005).

O teste do Papanicolau é um exame ginecológico de citologia cervical que é adotado como referência pelos programas de controle de câncer de colo de útero no Brasil (INCA, 2016a). Ele foi desenvolvido por George N. Papanicolau em 1939, e é utilizado na rotina médica até hoje. O exame é realizado a partir da coleta de material biológico do colo do útero, seguido de um esfregaço em lâmina, coloração, e análise ao microscópio óptico com o propósito de verificar a existência de células anormais indicando uma lesão que pode levar ao câncer (RAMA et al., 2008).

Papanicolau criou uma classificação que observava se as células do esfregaço eram normais ou não. As lâminas são divididas nas classes I, II, III, IV e V, que indicam: na classe I, ausência de células atípicas ou anormais; classe II citologia atípica, mas sem evidências de malignidade; classe III citologia sugestiva, mas não conclusiva de malignidade; classe IV, citologia fortemente sugestiva de malignidade; e classe V citologia conclusiva de malignidade (INCA, 2006).

Esta nomenclatura não se preocupava com os aspectos histológicos das lesões que surgiam, assim novas nomenclaturas surgiram mais atentas a esses significados. O termo displasia, desenvolvimento anormal das células, foi incorporado levando em conta as alterações histológicas e é dividido em displasia leve, moderada e severa. Estes graus de displasia eram impropriamente referentes à classe III de

Papanicolau e também à classe IV com carcinoma escamoso *in situ*. A classe V continuou indicando carcinoma invasor. Começaram, então, a dar ênfase às alterações celulares devido a ação do HPV e foram evidenciadas a coilocitose (células abauladas e vacuolizadas na periferia da célula) e discariose alteração nuclear com núcleo disforme, dividindo em 2 ou mais (INCA, 2012).

Posteriormente introduziu-se o conceito de neoplasia intraepitelial e, no caso do colo do uterino, de Neoplasia Intraepitelial Cervical - NIC, podendo ser dividida em três graus: 1, 2 e 3. A NIC 1 corresponde a displasias leve, a NIC 2 a displasia moderada e a NIC 3 displasias graves e CIS (Carcinoma *in situ*) (GUSTAFSSON, ADAMI, 1989).

A nomenclatura para o exame do Papanicolau foi modificada inúmeras vezes e adicionada novos termos e por convenção foi acordado que o sistema *Bethesda* seja incorporado aos laudos dos exames (SOCIEDADE LATINOAMERICANA DE CITOPATOLOGIA em 2013), conforme mostra a tabela 3. Esta classificação representa o comportamento biológico das lesões intraepiteliais escamosas do colo, subdividindo as lesões epiteliais escamosas anormais em quatro grupos:

- a. ASCUS - células escamosas atípicas de significado indeterminado;
- b. ASCH - células escamosas atípicas, não podendo excluir lesão intraepitelial escamosa de alto grau;
- c. LSIL - lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau, envolvendo displasia leve/ Neoplasia Intraepitelial Cervical I (NIC I)
- d. HSIL - lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, incluindo displasia moderada/NIC II, displasia severa e carcinoma *in situ*/NIC III, Câncer invasivo. (SOLOMON et al., 2002; BARCELOS et al., 2011)

Tabela 3_ Comparação entre as diferentes classificações utilizadas em exames citológicos.

Classes Papanicolau	Descrição	Gradação NIC	Sistema Bethesda
I	Normal	Normal	Normal
II	Atipia Reativa/Inflamatória	Atipia	Normal
II/III	Atipia Suspeita	Atipia	ASCUS
II/III	Atipia com HPV	Atipia. Condiloma	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia leve	NIC-I	SIL de baixo grau (LSIL)
III	Displasia Moderada	NIC - II	SIL de alo grau (HSIL)
III	Displasia Acentuada	NIC -III	SIL de alto grau (HSIL)
IV	Carcinoma <i>in situ</i> (CIS)	NIC - III	SIL de alto grau (HSIL)
V	Câncer Invasivo	Câncer Invasivo	Câncer Invasivo

Fonte: Adaptado de Miranda, 2011.

Dados mostram que as triagens citológicas diminuem os números de casos de câncer cervical e como consequências as taxas de morte em quase 70%. (KITCHENER, CASTLE, COX, 2006 e GUSTAFSSON et al., 1997).

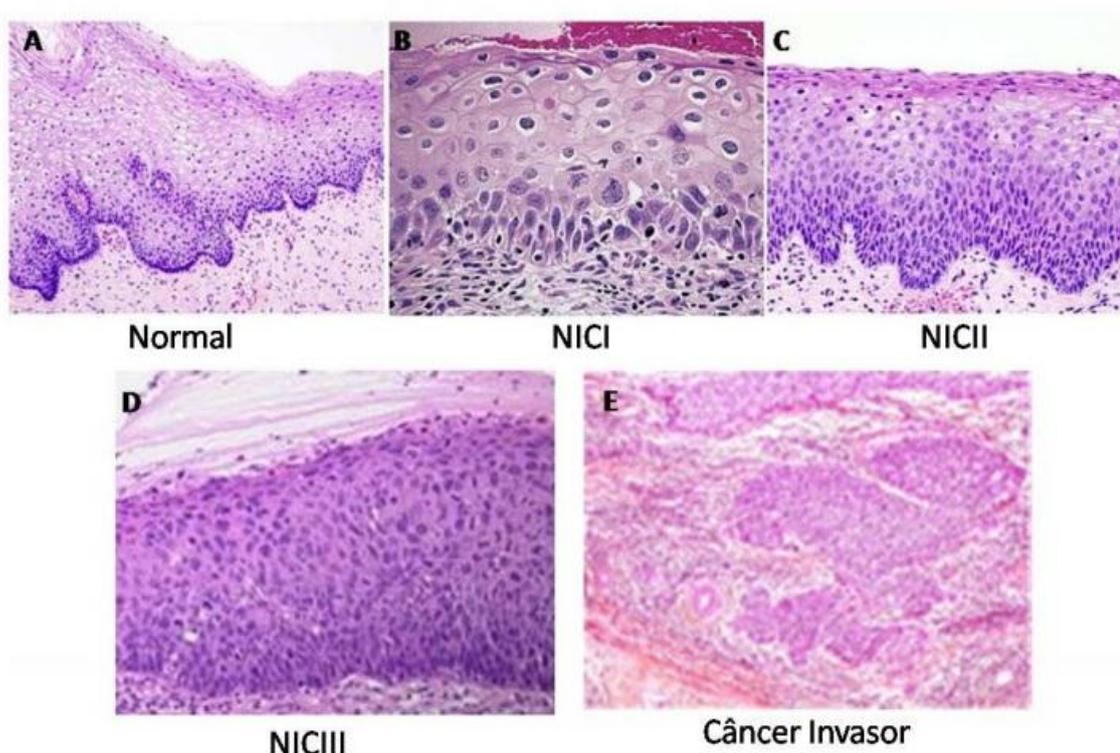
Kitchener, Castle e Cox (2006) realizaram um levantamento mostrando que em países desenvolvidos como Finlândia Suécia, Dinamarca e Islândia, os quais adotaram programas de rastreamento citológico, o índice de câncer cervical caiu mais em 50%. Nos Estados Unidos as taxas caíram ainda mais, chegando a 75% desde quando o programa foi adotado em 1960. Já em países da América Central e do Sul os programas de rastreio até existem, mas a qualidade e o acesso a tratamento são insuficientes, com isso as taxas de câncer cervical permanecem altas.

Do ponto de vista laboratorial e clínico, os testes citológicos apresentam alta especificidade (98%), mas apresentam sensibilidade limitada (51%), baixa reprodutibilidade e são trabalhosos. Além disso, os resultados são subjetivos, podendo sofrer variações quanto a interpretação das lâminas pelo técnico (NANDA et al., 2000). Já a citologia de base líquida ou em meio líquido fixador tem um custo mais elevado, porém apresenta a vantagem de ter maior representatividade das células coletadas transferidas para a lâmina diminuindo os resultados inconclusivos e maior sensibilidade para detectar lesões de alto grau (SYRJÄNEN et al., 2005).

1.5.1.2. Histopatologia:

Os estudos histológicos conseguem verificar alterações no epitélio celular do colo do útero provocadas pela infecção do HPV. É coletada uma biópsia durante o exame de colposcopia para a análise do tecido em laboratório. Na análise, o técnico verifica o efeito citopático da infecção viral que pode ser: presença de coilocitose - células com grandes vacúolos perinucleares; disqueratose - queratinização imperfeita das células epidérmicas; e discoriose - aumento e irregularidade na forma dos núcleos e hiperchromatismo (MANZIONE, NADAL, CALORE, 2004). Caso a proliferação celular anormal ocupe um terço inferior do epitélio é classificada com NIC I, ocupando dois terços do epitélio, NIC II e ocupando todo o epitélio, NIC III (WRIGHT, 2006), como se vê na figura 6.

Figura 6_ Lesões precursoras do carcinoma.



Fonte: Adaptado de Lima, 2012.

Legenda: Seis cortes histológicos (A, B, C, D e E) mostrando secções de lesões precursoras do carcinoma. A- Lâmina mostrando o epitélio escamoso normal com uma única camada de células basais, camadas intermediárias e superficiais ricas em glicogênio, apresentando núcleos picnóticos (aumento 100X). B- Lâmina em estágio NIC I com uma desorganização no terço basal do epitélio e coilócitos nas camadas superiores (aumento de 400X). C- Lâmina em estágio NIC II com desorganização nos dois terços basais do epitélio e critério celular de malignidade e infecção viral (aumento de 100X) D-Lâmina em estágio NIC III, as células apresentam um alto grau de anormalidade nuclear e celular em toda a espessura do epitélio (aumento de 100X) E – Lâmina que apresenta carcinoma de células escamosas invasoras moderadamente diferenciado, com presença de necrose e reação inflamatória (aumento de 100X)

1.5.2. Testes Moleculares

Existem hoje inúmeras técnicas moleculares para identificação do DNA ou RNA em infecções por HPV. Elas apresentam alto grau de sensibilidade e especificidade comparadas com os testes citológicos e histológicos; podem também determinar qual genótipo viral está envolvido na infecção e com isso determinar quais mulheres podem ter um risco maior de desenvolver o câncer cervical (MOLIJN et al., 2005; CASTLE et al., 2004). Além disso, os testes moleculares diminuem a quantidade de pacientes com resultados falso-negativos ou indeterminados na citologia, servindo

também como marcadores de rastreio em pacientes que já realizam o tratamento (CALDAS, TEIXEIRA, RAFAEL, 2010b).

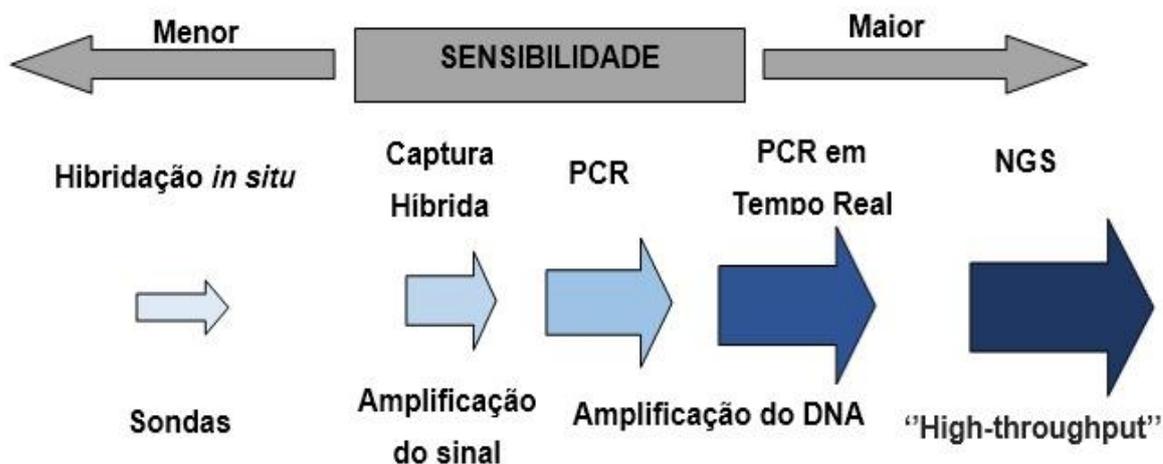
Enquanto os exames citológicos sugerem um possível resultado, os testes moleculares confirmam e ainda mostram qual é o genótipo do vírus antes mesmo do surgimento das alterações, auxiliando o médico no seguimento do paciente. Quando os dois exames são associados ocorre o aumento da eficiência do rastreio e de sua sensibilidade, diminuindo os casos de falsos-negativos. Com isso mulheres que apresentem dois testes negativos em anos consecutivos podem postergar o próximo teste (SYRJÄNEN et al., 2005).

As técnicas moleculares são de grande importância para identificar e quantificar o vírus do HPV em uma infecção, possibilitando uma triagem entre as pacientes determinando quem tem maior risco em desenvolvimento de câncer cervical. De maneira geral as principais técnicas moleculares para identificar o HPV podem ser de 4 tipos:

1. Hibridização com sondas de ácidos nucleicos (Ex.: *Southern blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* - ISH, hibridação *in situ* com fluorescência – FISH), que foram as primeiras técnicas a serem utilizadas, possuem sensibilidade variada e requerem um tempo razoável para execução;
2. Amplificação de sinal (Ex.: teste de Captura Híbrida - CH1 e CH2), que são ótimas ferramentas para triagem em massa de pacientes com anomalias citológicas, embora ela não determine o genótipo viral presente;
3. Reações de amplificação (Ex.: PCR, RFLP), permitem amplificar regiões específicas do DNA, conseguindo detectar, genotipar e quantificar a carga viral;
4. Sequenciamento de Nova Geração – NGS, técnica promissora e relativamente nova, permite a detecção, genotipagem e quantificação da carga viral, não só de um vírus, mas sim de todos os microrganismos presentes na amostra citológica (HUBBARD, 2003 e MOLIJN et al., 2005).

A figura 7, a seguir, representa os quatro tipos de técnicas apresentadas acima.

Figura 7_ Teste moleculares e o grau de sensibilidade utilizados no diagnóstico do HPV.



FONTE: Adaptado de Hubbard, 2003.

1.5.2.1. Captura Híbrida 1 e 2 (CH)

A Captura Híbrida é uma técnica de hibridização molecular sofisticada, com a amplificação do sinal dos híbridos formados, que são detectados pela reação de enzima substrato, posteriormente é feita a leitura por quimiluminescência (BAGARELLI, OLIANI, 2004). Ela é a principal técnica utilizada no Brasil para detectar o vírus do HPV em amostra de colo do útero, sendo a única aprovada pelo *Food and Drug Administration* - FDA e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2002).

A técnica consiste a princípio, na desnaturação do DNA da amostra a ser pesquisado. Este DNA viral é hibridizado com múltiplas sondas de RNA de 18 genótipos específicos de HPV, não marcadas, em tubos contendo solução tampão, como descrito na Tabela 4. Estas sondas mistas de RNA detectam dois grupos de HPV: tubo A reconhecem os genótipos de HPVs de baixo risco e tubo B os genótipos de HPV de alto risco. Alguns laboratórios utilizam as duas sondas simultaneamente ou separadamente. A técnica de captura híbrida distingue o grupo A e B, porém não consegue diferenciar qual é o genótipo do HPV exato (CALDAS, TEIXEIRA, RAFAEL, 2010a).

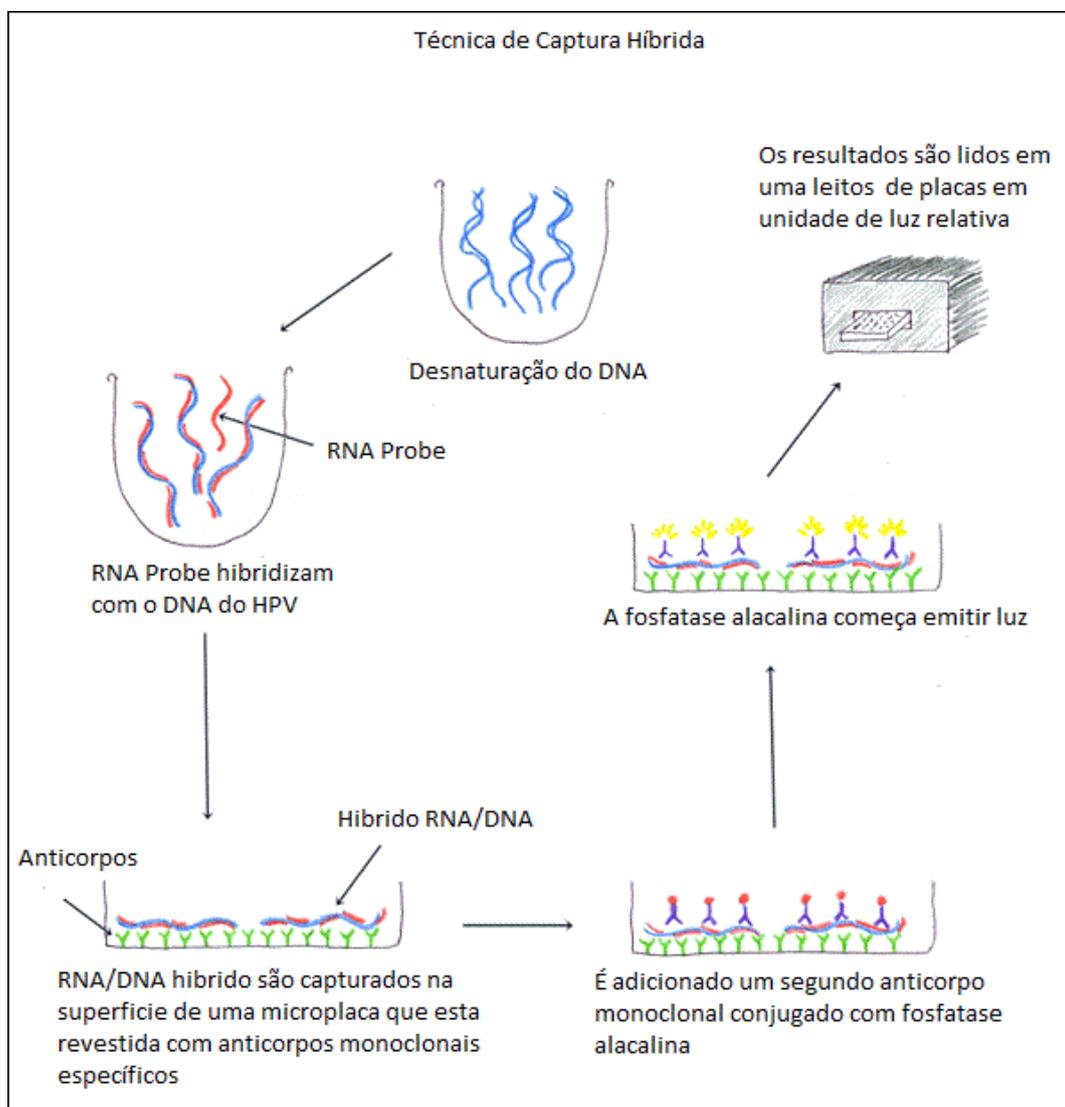
Tabela 4_ Grupos analisados na técnica da captura híbrida

Grupo analisado	Genótipo do HPV
Baixo Risco	6, 11, 42, 43 e 44
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68

Fonte: Adaptado de Caldas, Teixeira, Rafael, 2010a.

Em seguida os híbridos de RNA/DNA são capturados na superfície de uma microplaca que está revestida com anticorpos específicos de captura. Estes são expostos a um anticorpo conjugado à fosfatase alcalina, e detectados por um sensível sistema de amplificação de sinal quimioluminescente (NONNENMACHER, BREITENBACH, 2002). Os resultados mostram valores em Unidade Relativa de Luz – RLU, com valor de corte maior ou igual a 1 para a presença do vírus. É importante salientar que os resultados dependem do número de células infectadas. Coletas de material biológico mal realizadas e em consequência baixo número de células irão, com certeza, gerar resultados em que o valor de RLU será muito baixo (ENFERMAGEM, 2011). A figura 8, a seguir, apresenta resumidamente os principais passos para realização da técnica da captura híbrida.

Figura 8_ Representação esquemática da técnica de captura híbrida mostrando os principais passos para realização de um exame.



Fonte: Adaptado de Look for Diagnosis, 2016.

De acordo com Stillman, Day, Schutzbank (2009) a técnica de captura híbrida apresenta 98,1% de sensibilidade e 97,6% de especificidade. Ela se tornou padrão em muitos países sendo amplamente utilizada em estudos clínicos. No entanto, a captura híbrida apresenta algumas limitações, uma vez que, embora possa distinguir entre os grupos de alto e baixo risco oncogênico, não permite fazer a identificação de genótipos específicos de HPV (BURD, 2003).

1.5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

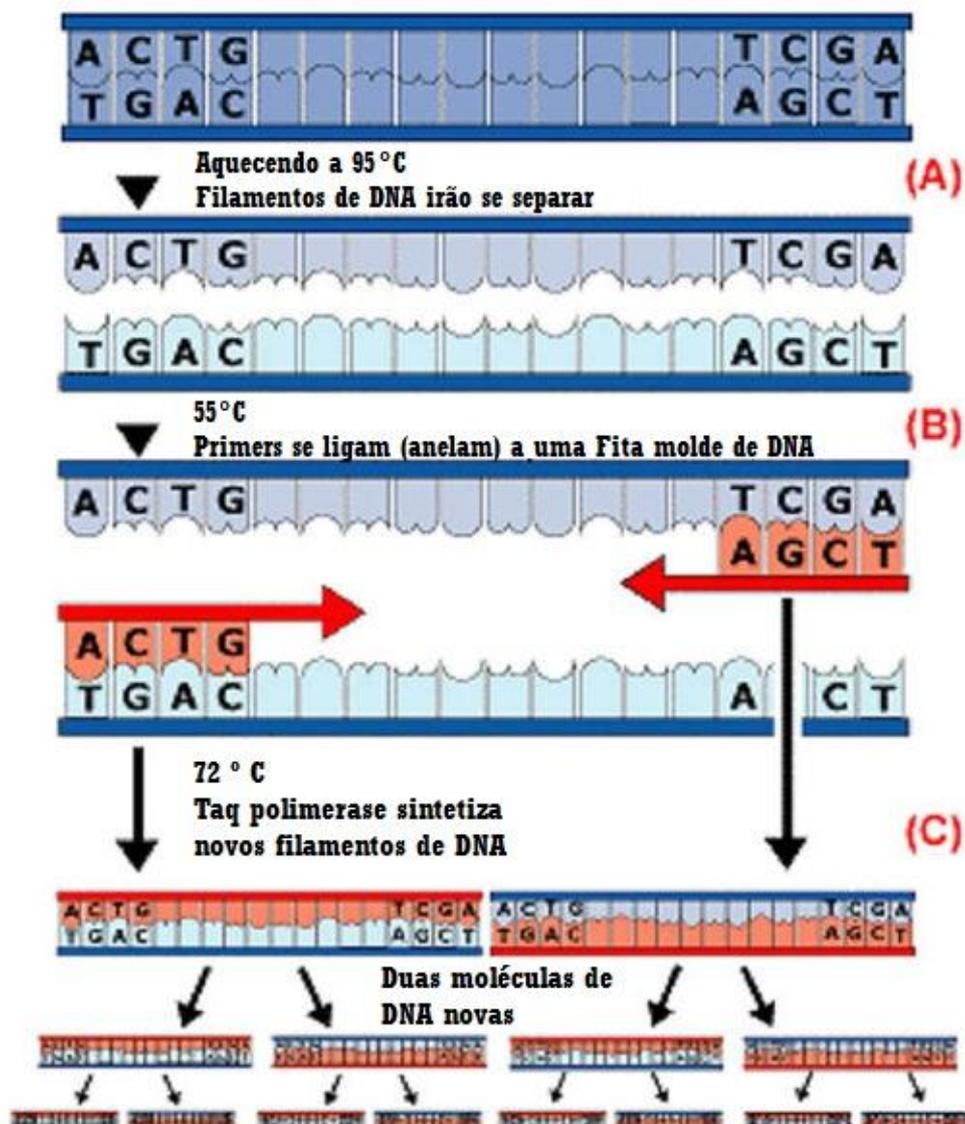
A reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação de DNA ou RNA *in vitro* pelo qual uma região pode ser especificamente replicada. A técnica foi descrita por Kary Mullis em 1983 e é uma das mais comuns em laboratórios de pesquisas médicas e biológicas. Nela é necessária a presença de dois oligonucleotídeos (*primers*) que flanqueiam a região de interesse e são realizadas inúmeras reações cíclicas catalisadas por uma DNA polimerase, no final do processo obtemos bilhões de sequências específicas da região a qual desejamos amplificar, ver figura 9 (ROCHE, 2015a).

A técnica da PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade e permite detectar menos de 10 cópias de DNA de HPV em uma amostra. No caso do HPV, as reações de amplificação utilizam sequências alvos de oligonucleotídeos, tipo específico ou consenso, que permite amplificar sequências de DNA de diferentes genótipos do HPV por ser uma região conservada (VILLA, DENNY, 2006).

Após a amplificação do DNA os produtos da PCR podem ser analisados de diferentes formas: eletroforese em gel - poliacrilamida ou agarose; *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP; hibridização em pontos - *dot blot*; hibridização reversa em linhas - *Reverser Line-Blot Method*; e o sequenciamento direto do DNA (GRAVITT et al., 1998; VERTERAMO et al., 2006; COSER et al., 2011).

Atualmente, a empresa Roche desenvolveu o primeiro teste comercial para identificar o HPV por PCR aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 12 de março de 2014. Ele utiliza amostras de células cervicais e fornece informações específicas da genotipagem para o HPV 16 e 18 que correspondem a mais de 70% do câncer cervical e simultaneamente mais outros 12 genótipos de HPV de alto risco (ROCHE, 2015b).

Figura 9_ Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase (PCR).



Fonte: Modificado Bartlett et al., 2003.

Legenda: A PCR é um processo/termo cíclico que inclui três etapas. A – Desnaturação da dupla fita de DNA, formando duas fitas simples; b – Anelamentos dos oligonucleotídeos que se hibridizam especificamente a sequência complementar ao DNA alvo. C- Incorporação dos nucleotídeos pela *TAq* DNA polimerase gerando uma fita filha, que vão servir como molde para os próximos ciclos que em média são 35.

Para identificação molecular do HPV por PCR, existem inúmeras combinações de oligonucleotídeos para amplificar regiões do DNA de diferentes partes do genoma viral. Entre os mais empregados são o MY09/11 (MANOS, 1989), GP5/GP6 (SNIJDERS et al., 1990), PGMY (GRAVITT et al., 2000), GP5+/GP6+ (DE RODA HUSMAN et al., 1995), SPF10 (KLETER et al., 1999), LC1/LC2 (ASATO et al., 2004), LCR-E7 (SASAGAWA et al., 2000), pU-1m/pU-2R (FUJINAGA et al.,

1991), região E1 (GREGOIRE et al., 1989), e E6CF4/E7CR3 (YAMAGUCHI et al., 2002).

Para a detecção do HPV em estudos clínicos e epidemiológicos o sistema que emprega os iniciadores MY09/MY11 é um dos mais utilizados. Ele é uma mistura de 24 oligonucleotídeos que amplifica parte do fragmento do gene L1, que é muito eficaz para identificar um amplo espectro de genótipos de HPV; 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, IS39, CP8304(62), CP6108(91), MM4(82), MM7(83) e MM8(84) (IFTNER, VILLA, 2003).

1.5.2.3. Sequenciamento Direto

Outra abordagem para identificação do HPV pode ser realizada a partir das análises das sequências dos produtos da PCR que tem como alvo o genoma do vírus. O sequenciamento do DNA foi descrito inicialmente por Sanger em 1981 e vem sendo utilizado em muitos estudos como meio de genotipagem dos vírus, sendo considerado padrão ouro por inúmeros autores, pois permite identificar todos os genótipos do vírus, inclusive casos raros e novos (GHARIZADEH et al., 2005, CAPRA et al., 2008, LEE et al., 2007 e SPEICH et al., 2004). A figura 10 apresenta esquemática o processo do sequenciamento de DNA.

A pesquisa ocorre da seguinte maneira: é realizado um PCR utilizando *primers* tendo como alvo alguma região do genoma do HPV, em seguida é realizada uma reação de sequenciamento e a corrida no equipamento para saber as sequências de bases. Posteriormente estas sequências do DNA, são analisadas por homologia com um banco de dados que contém todas as sequências dos diferentes genótipos do HPV, um deles é o NCBI/BLAST¹, um dos mais conhecidos e pode ser acessado gratuitamente (ALTSCHUL et al., 1990).

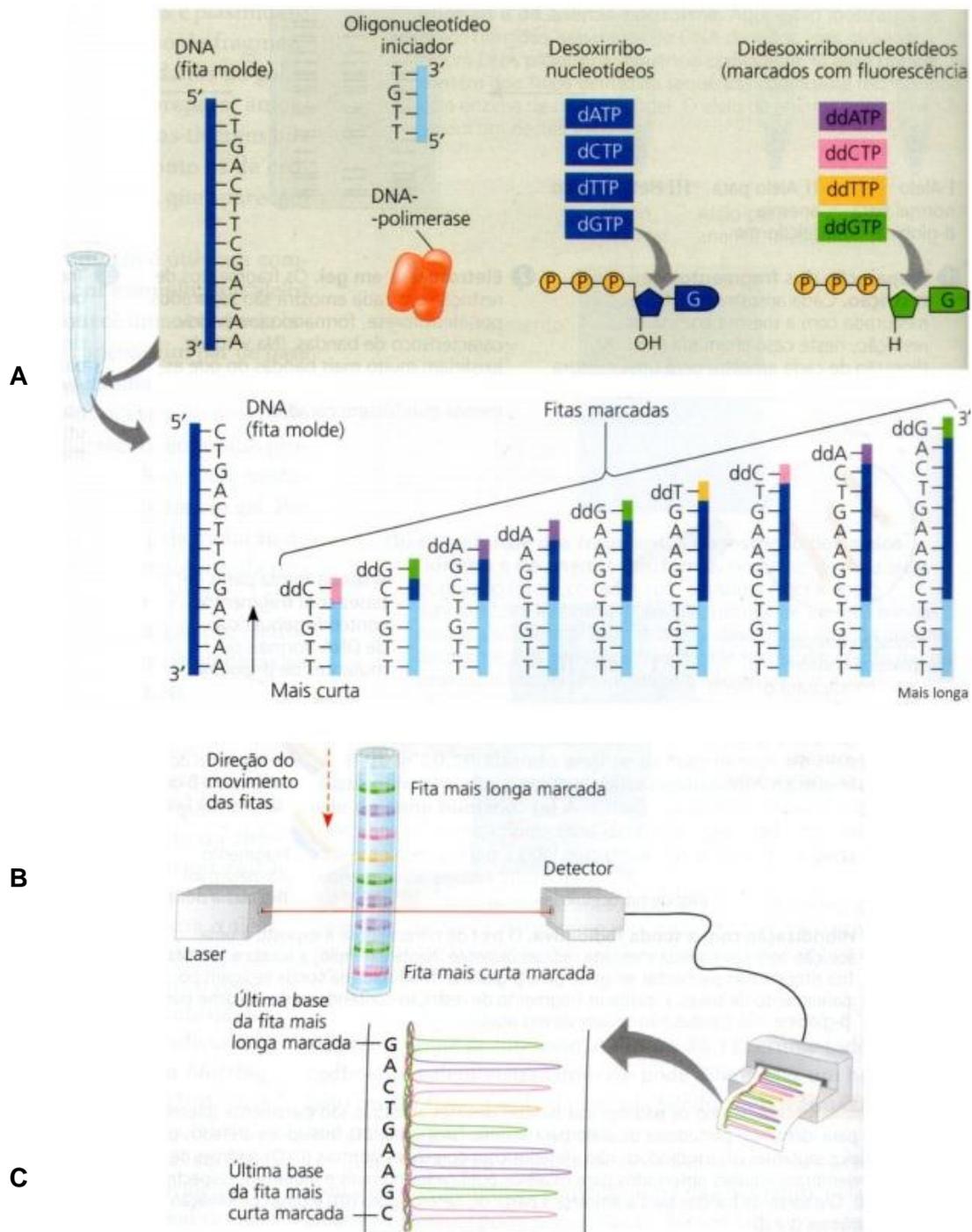
Contudo, a técnica de sequenciamento para identificação do vírus apresenta algumas limitações, como por exemplo quando amostras clínicas contêm dois ou mais genótipos muitas vezes acabam não conseguindo ser identificadas por causa da sobreposição das sequências do DNA ou em um outro caso, quando ocorre a infecção de dois ou mais genótipos e apenas o que tiver maior prevalência

¹ National Center for Biotechnology Information - NCBI/BLAST: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

na amostra pode ser identificado, com isso subestimando a prevalência de infecções com múltiplos genótipos em estudos epidemiológicos e de acompanhamento (KLETER et al., 1999, MOLIJN et al., 2005 e CAPRA et al., 2008).

Para contornar esta dificuldade pode ser necessário o uso dos sequenciadores de nova geração como o *Next Generation Sequencing* - NGS, que permitem identificar múltiplas infecções e outros agentes patogênicos na amostra biológica que acabam não sendo reconhecidos pelos testes convencionais (PRACHAYANGPRECHA et al., 2014).

Figura 10_ Representação esquemática do processo do sequenciamento de DNA pelo método Sanger.



Fonte: Adaptado de Valones et al., 2009.

Legenda: Representação esquemática do processo do sequenciamento de DNA pelo método Sanger. A- Indica reação de sequenciamento utilizando nucleotídeos marcados. B- Leitura dos produtos de sequenciamento utilizando um sequenciador automático. C – Eletroferograma com as sequências do DNA obtido.

1.5.2.4. PCR em tempo real (Real time PCR)

A técnica da PCR em tempo real (PCR-RT) é uma variação do método convencional, que combina a amplificação de sequências específicas do DNA realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com a detecção do sinal fluorescente de uma ou mais reações ao longo dos ciclos de amplificação. Ao longo dos últimos anos esta técnica tem revolucionado a forma como os laboratórios clínicos realizam o diagnóstico permitindo a detecção e a quantificação de doenças infecciosas e parasitárias (CAVALCANTI, MARIA, LORENA, 2008).

Existem inúmeras químicas fluorescentes utilizadas na PCR em tempo Real que permitem o monitoramento em tempo real. Os principais são o SYBRGreen[®], um corante que tem afinidade preferencial por DNA dupla fita que quando ligado emite um sinal de fluorescência. Durante os ciclos consecutivos da PCR, esta substância interage com os *amplicons* recém-formados produzindo fluorescência diretamente proporcional a quantidade destes. Porém esta tecnologia possui uma desvantagem, ocorrendo amplificações inespecíficas estas serão detectadas, interferindo na quantificação final dos produtos. Para contar esta desvantagem foi desenvolvida a curva de *melting* ou curva de dissociação, que permite verificar a especificidade do produto amplificado indicada por um ponto correspondente a temperatura de dissociação do produto amplificado (VETTER et al., 2006).

Outro sistema bastante utilizado é o TaqMan[®], uma sonda (oligonucleotídeos linear de 20-30pb) que é desenhado na região interna da sequência que se deseja amplificar. Ela possui uma molécula fluorescente - *reporter* na extremidade 5' e uma molécula bloqueadora - *quencher* na extremidade 3', quando estas duas moléculas estão próximas na reação, o sinal do *reporter* é absorvido pelo *quencher* e o equipamento não detecta nenhum sinal da fluorescência. No entanto, quando existe a presença do DNA alvo a sonda se hibridiza na fita de DNA e uma nova fita de DNA é sintetizada incorporando nucleotídeos pela Taq DNA Polimerase. Esta enzima possui atividade exonuclease 5'-3' e cliva a sonda durante a extensão separando o *quencher* do *reporter* e com isso é emitindo um sinal fluorescente que o equipamento consegue captar (MORTARINO et al., 2004; YANG, ROTHMAN, 2004). A emissão da fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado e, portanto,

as análises podem ser qualitativas ou quantitativas sendo usadas como método para determinar a carga viral (RODRIGUES, 2009).

As vantagens da PCR em tempo real, em relação a PCR convencional são: a capacidade de monitorar o processo, as reações ocorrem mais rapidamente, maior reprodutibilidade dos resultados, capacidade de quantificação de alta precisão e a amplificação e a detecção ocorrem em um único tubo eliminando a manipulação pós-PCR. Como desvantagem pode-se citar o alto custo do equipamento e sua utilização requer mão de obra altamente treinada e qualificado (VETTER et al., 2006).

1.5.2.5. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Atualmente os laboratórios, em grande parte, realizam ensaios específicos para cada espécie de microrganismos que desejam diagnosticar em uma amostra biológica. Isso contribui para aumentar a sensibilidade de detecção, mas acaba aumentando os custos dos exames, pois são necessários muitos ensaios para testar uma gama alta de microrganismos e em muitos casos o agente etiológico não pode ser identificado. Por isso novas tecnologias para a pesquisa e diagnóstico clínico vem sendo desenvolvidas e uma delas é o Sequenciamento De Nova Geração – NGS, do inglês *Next Generation Sequencing* (SAEED et al., 2007).

Esta nova tecnologia é conhecida pela grande quantidade de dados de sequências de DNA obtidas e vem sendo utilizada com muito sucesso no campo da virologia, com a descoberta de novos vírus, reconstrução de genomas e análise de variantes. Com a ajuda da bioinformática é possível a rápida identificação de patógenos conhecidos simultaneamente e de novos os quais não são identificados nos testes convencionais (CAPOBIANCHI, GIOMBINI, ROZERA, 2013). Suas principais desvantagens são o custo elevado, alta demanda de amostra, tempo de resposta, exigência de investimento em ferramentas de bioinformática, bancos de dados, treinamento de pessoal e a interpretação dos dados (PRACHAYANGPRECHA et al., 2014).

O sequenciamento de DNA baseado pelo método Sanger obteve grande sucesso e esteve envolvido em quase todos os projetos de genômica nos últimos 30 anos. Apesar de sua robustez, ela apresentava desvantagens que iam desde a necessidade de uso de bibliotecas de clones para a preparação das

amostras, custo elevado, demora para sua realização e a baixa velocidade de produção dos dados obtidos. O projeto do Genoma Humano (PGH) foi a primeira iniciativa que uniu inúmeros laboratórios no mundo para o sequenciamento em larga escala, e teve a duração total de 13 anos ao um custo de US\$ 2,7 bilhões (MARDIS, 2008). Porém havia a necessidade de os sequenciamentos terem menores custos, maior rapidez e maior eficiência.

A partir de 2005, começaram a surgir as primeiras plataformas NGS no mercado, proporcionando o sequenciamento em larga escala, em menor tempo, mais barato e acessível. Durante estes últimos 12 anos o custo do sequenciamento genético apresentou uma queda exponencial, tornando a técnica uma prática rotineira em diversos laboratórios tanto de pesquisa como na parte clínica, sequenciado desde genes, painéis, exomas até o genoma completo de um indivíduo. Concomitantemente a geração de dados cresceu e inúmeras ferramentas computacionais foram desenvolvidas com o objetivo de acelerar a capacidade da análises de dados aumentando a interação entre a biologia molecular e a informática, conhecida como bioinformática (ANSORGE, 2009).

O primeiro equipamento foi apresentado pela empresa 454 Life Science, o sequenciador GS20/FLX - 454, que consistia na paralelização do processamento de sequenciamento, utilizando a nanotecnologia e a metodologia do pirosequenciamento. Posteriormente outras tecnologias surgiram entre os anos de 2006 e 2007, como da empresa Solexa[®] com o sistema Genoma *Analyzer*[®] e *Agencourt*[®] com o sistema base para o SOLiD[™]. Todas estas empresas foram adquiridas por gigantes do mercado. Em 2006 a *Agencourt*[®] foi comprada pela *Applied Biosystems/Life Technologies*[®] e em 2007 a 454 Life Science foi adquirida pela Roche[®] *Applied Science*. Por fim, a Solexa[®] passou a ser controlada pela Illumina. Estas empresas prevendo uma grande oportunidade de negócio no mercado do sequenciamento do DNA, investiram ainda mais e reforçaram a visão do genoma por mil dólares (BENNETT et al., 2005; JANITZ, 2008; MARDIS, 2008; WOLD, MYERS, 2008)

Atualmente a Illumina detém 71% do mercado global de sequenciadores de nova geração, seguidos por 16% da *Life Technologies*, 10% da Roche e 3% da *Pacific Biosciences*[®]. Este mercado gerou em 2014 aproximadamente US \$2,5 bilhões e os analistas preveem que em 2020 chegue a US \$8,7bilhoes (RESEARCH, 2016). Como a Illumina detém boa parte do mercado

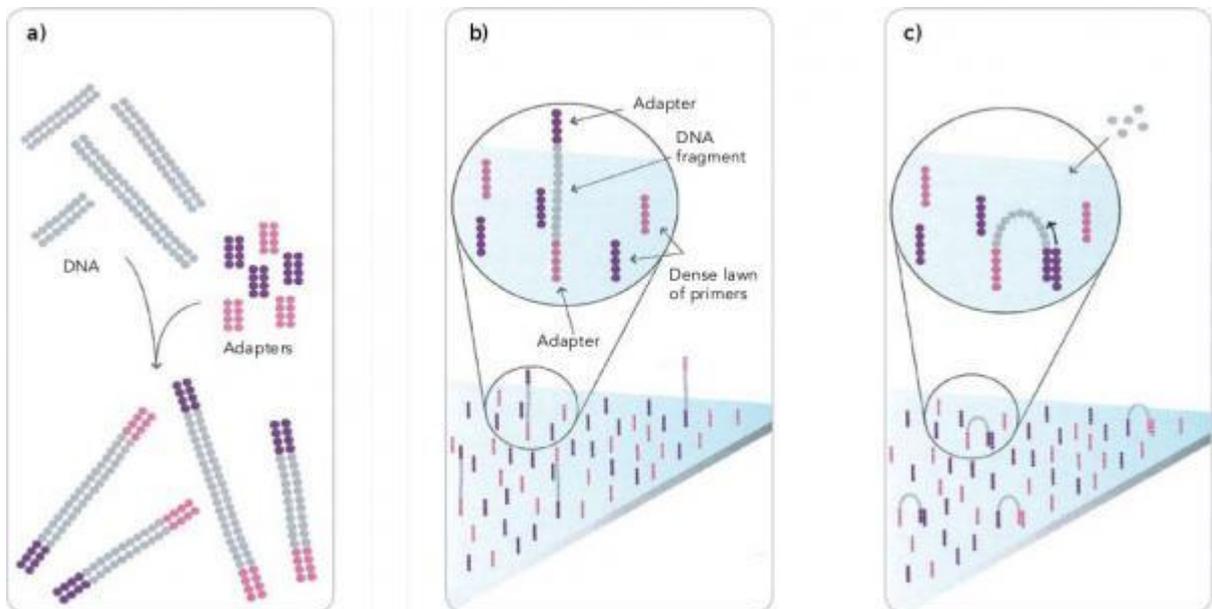
de sequenciadores de nova geração ela foi utilizada neste trabalho. Deste modo será discutido mais a respeito de sua tecnologia.

A Solexa® foi criada em 1997 por dois cientistas, Shankar Balasubramanian e David Klenerman, no departamento de Química da Universidade de Cambridge. Ao longo dos anos com muita pesquisa e investimento a Solexa, em 2007 foi adquirida pela Illumina (ILLUMINA, 2016a).

O princípio químico do sequenciamento por síntese é semelhante ao sequenciamento Sanger, mas utiliza quatro tipos de nucleotídeos marcados por um sinal de fluorescência com a capacidade de terminação reversível (que bloqueia a progressão da polimerização) e uma enzima DNA Polimerase modificada para incorporá-los. O resultado final é um sequenciamento base por base, o que permite que os dados sejam mais precisos para uma ampla gama de aplicações. (ILLUMINA, 2016; ANSORGE, 2009).

Para realização da técnica é necessário a fragmentação do DNA aleatoriamente e em seguida dois tipos diferentes de adaptadores são ligados nas extremidades de cada fragmento. Posteriormente estes fragmentos são desnaturados e imobilizados aleatoriamente, por uma das extremidades, em uma lâmina própria da tecnologia chamada *FlowCell*, que é revestida por uma densa camada de oligonucleotídeos complementares aos dois tipos de adaptadores dos fragmentos, como representado na figura 12 (ANSORGE, 2009; CAPOBIANCHI, GIOMBINI, ROZERA, 2013).

Figura 11_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*” – Fragmentação de DNA.

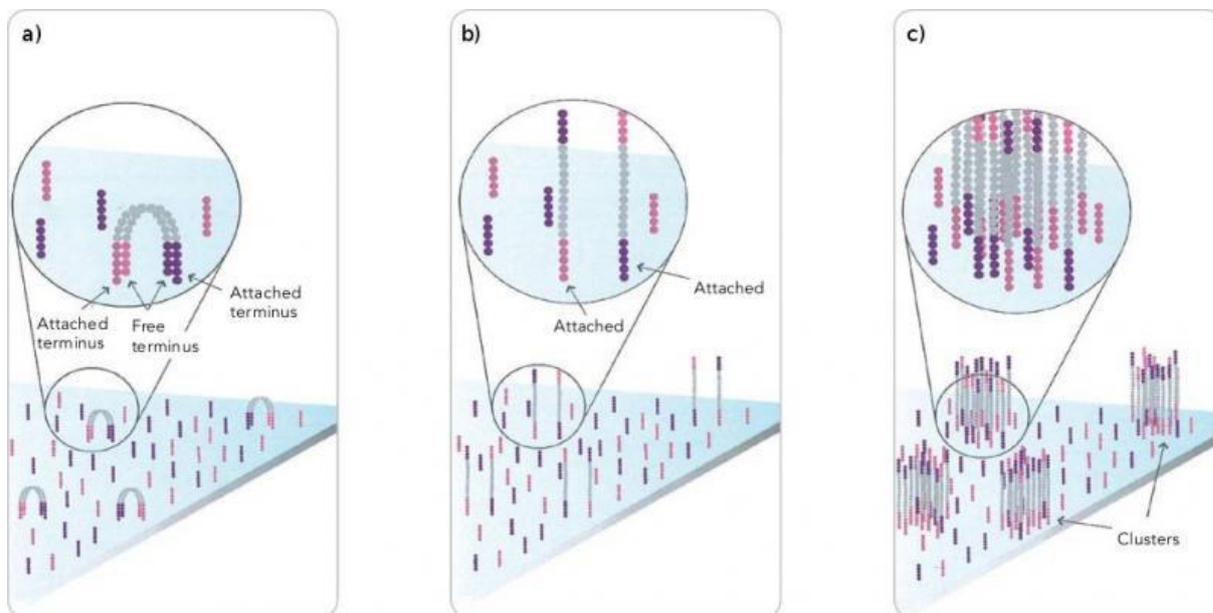


Fonte: Adaptado de Uppnex, 2016.

Legenda: Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*”. A – Os adaptadores são unidos na extremidade dos fragmentos gerados aleatoriamente. B- Os fragmentos são distribuídos aleatoriamente e ligados em toda a superfície da “*FlowCell*”. C- A amplificação por pontes se inicia e os fragmentos de terminação livre se ligam a uma sequência complementar à placa.

Depois de imobilizados os fragmentos, inicia-se um processo chamado clusterização um PCR de fase sólida. Os fragmentos são sintetizados e multiplicados usando uma técnica de amplificação por “ponte”, gerando pequenos aglomerados (*Clusters*) de fragmentos simples fita. Estes *clusters* são formados livremente devido ao fato das novas cópias produzidas se ligarem na “*FlowCell*” mais próximas ao fragmento original. Após a fase de amplificação, depois de inúmeros ciclos, a “*FlowCell*”, fica coberta por esses *clusters*, que deve conter aproximadamente 1000 cópias de um mesmo fragmento. Como mostra a figura 12 (ANSORGE, 2009 e MARDIS, 2008).

Figura 12_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*” – Clusterização.

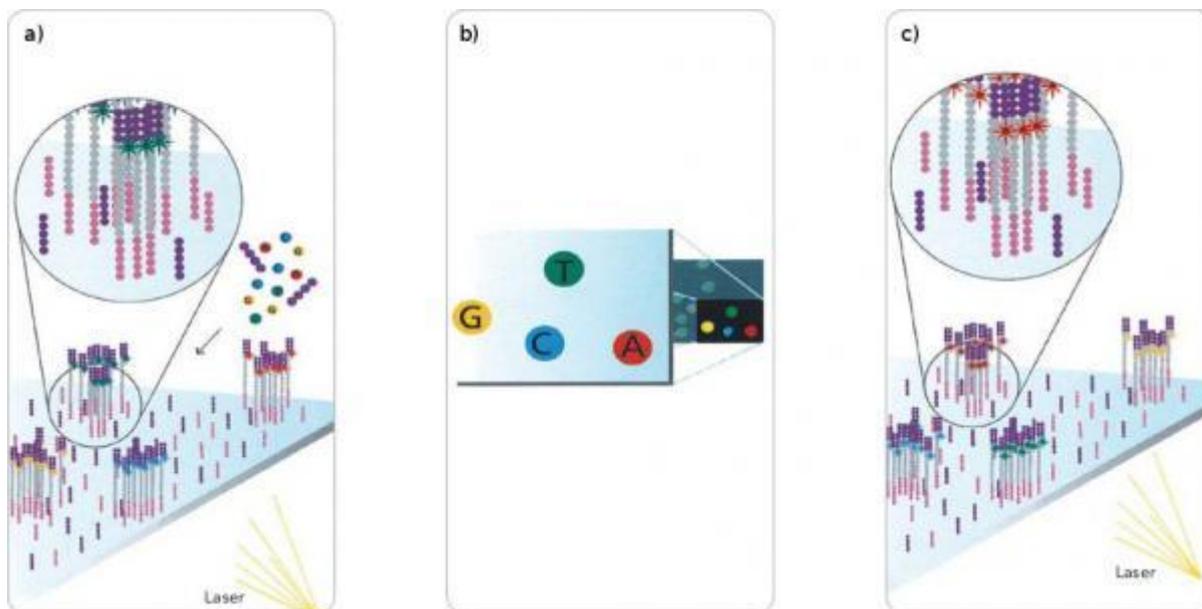


Fonte: Adaptado de Uppnex, 2016.

Legenda: Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis - Illumina*”. A- DNA polimerase incorporando os nucleotídeos para formar a ponte de fita dupla no substrato de fase sólida. B – Desnaturação no processo levando os fragmentos de DNA fita simples ancorados ao substrato. C - Terminando a fase de amplificação gerando milhões de clusters de fragmentos de DNA fita simples imobilizados na “*FlowCell*”.

Após a formação dos *clusters* o processo de sequenciamento por síntese se inicia. Uma mistura dos reagentes é adicionada na *FlowCell* que contém: os quatro nucleotídeos terminadores reversíveis marcados, oligonucleotídeos para iniciar a polimerização e a enzima DNA Polimerase. Depois de incorporar um nucleotídeo modificado a replicação é interrompida, os outros nucleotídeos não utilizados são descartados através de uma lavagem e um laser é utilizado para digitalizar a superfície da *FlowCell* que faz com que os corantes fluorescentes emitam luz de diferentes cores, cada cor corresponde a um tipo nucleotídeo. Uma câmera CCD grava a cor da luz, o que permite sua identificação e sua posição na superfície, vale lembrar que esta cor registrada é a luz emitida por apenas um *cluster*, e existem milhões deles em um *FlowCell*. Ao final da leitura o grupo bloqueador da extremidade 3' da base e o fluoróforo são removidos e o ciclo de síntese se repete novamente como mostra a figura 13 (ANSORGE, 2009; CAPOBIANCHI, GIOMBINI, ROZERA, 2013).

Figura 13_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*” - Sequenciamento por síntese.

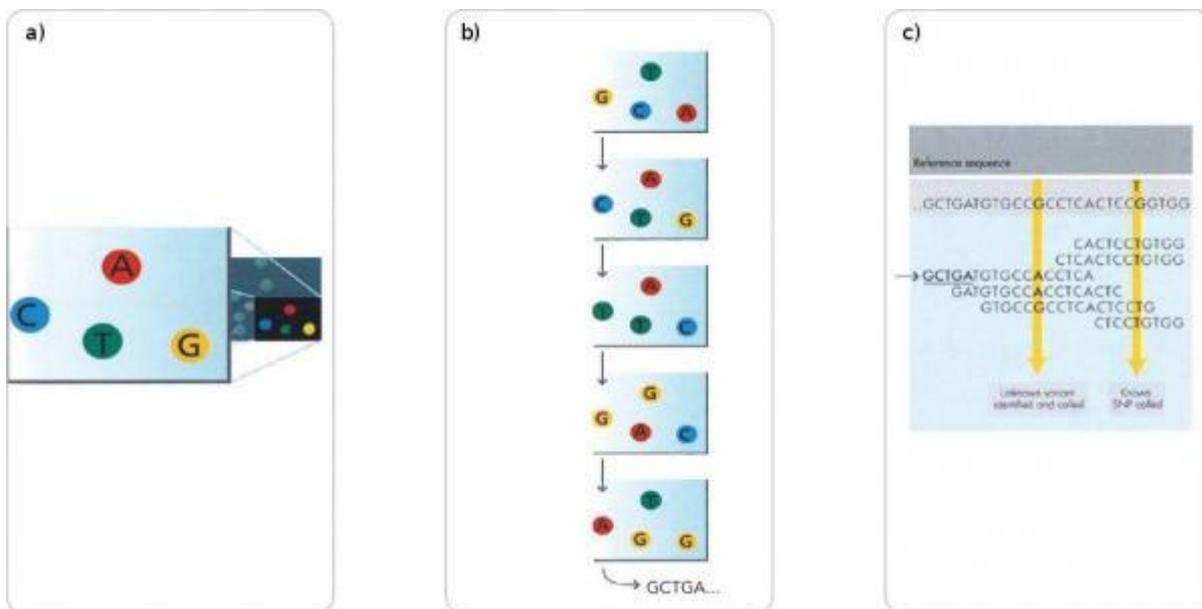


Fonte: Adaptado de Uppnex, 2016.

Legenda: Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*” - Sequenciamento por síntese. A- São adicionados os reagentes na *FlowCell* e ocorre o início do sequenciamento adicionando o primeiro nucleotídeo modificado. B- Um laser excita os corantes fluorescentes e uma câmera capta as cores que os cluster emitiram. C- Os nucleotídeos terminadores reversíveis são removidos e são adicionados novos reagentes e o ciclo se inicia novamente.

Uma vez que os nucleotídeos são reversíveis, é fácil a remoção da parte do terminador e o corante repetindo o processo. O processo de adição de um nucleotídeo, sua excitação pelo laser, leitura e a remoção do terminador é compreendida de um ciclo. O número de ciclos está atualmente limitado a 300 para o *Miseq* e 100 para *HiSeq2000*. Não é muito interessante ciclos longos devido às imperfeições da química, levando a um aumento da incerteza se aquela base está correta ou não. Isso resulta em uma redução na qualidade das bases para cada ciclo. A leitura da base é realizada através de análises sequenciais de cada uma das imagens obtidas, no ciclo do sequenciamento e posição do cluster. A cada base é atribuído um valor de qualidade que varia de 2 a 40, dependendo da certeza no *basecalling*, ver figura 14 (ANSORGE, 2009; MARDIS, 2008)

Figura 14_ Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*” – Leitura e Captação de dados.



Fonte: Adaptado de Uppnex, 2016.

Legenda: Representação esquemática da tecnologia de sequenciamento “*Sequencing by Synthesis – Illumina*”. A- Captura da imagem no segundo ciclo. B- Leitura das sequências ao longo de vários ciclos do sequenciamento. C- alinhamento de todas as sequências obtidas contra um genoma de referência.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral desse estudo foi a aplicar técnicas de biologia molecular para identificação do vírus do HPV em amostras biológicas coletadas do colo do útero humano.

2.2. Objetivos específicos

Comparar dois métodos de extração de DNA a partir de amostra de colo do útero;

Padronizar um protocolo de PCR com os *primers* MY09/MY11 para ser usado na rotina do laboratório para identificação do vírus;

Padronizar um protocolo para genotipagem do vírus, utilizando o sequenciamento direto – Sanger;

Padronizar um protocolo de rastreio do vírus do HPV em amostras biológicas utilizando o PCR em Tempo Real com SYBRGreen® e Taqman®;

Desenvolver metodologia utilizando o sequenciador de nova geração *MiSeq Illumina* para identificação do vírus em amostras coletadas de colo do útero;

Comparar a eficácia dos métodos apresentados e avaliar a possibilidade de sua aplicação na prática clínica

3. METODOLOGIA

3.1. Aspectos de ética

Este trabalho foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL UFSCar, nº do processo 053/2010 e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde.

3.2. Coleta das amostras

Antes de iniciar a coleta do material biológico foram explicados os objetivos do trabalho para as pacientes, os quais se tratavam de uma técnica experimental em fase de implantação, e como tal, sujeita a erros, que visava a comparação de diversas técnicas moleculares para identificação do vírus do HPV. Foi solicitado que elas assinassem o termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE e preenchessem o formulário de coleta.

No total foram coletadas amostras biológicas de 318 mulheres e a doação do material foi de caráter voluntário. Elas foram realizadas por um médico ginecologista por meio de raspagem da mucosa cérvico-vaginal, utilizando uma escova própria para isso de cerdas macias como mostrado na figura 15. Em seguida elas foram transferidas para tubos de 1,5mL identificados com os dados da paciente que continha um meio líquido tamponado que preservou a morfologia, DNA, o RNA e as proteínas das células. Caso não fosse realizado a extração do DNA no mesmo dia este material era conservado em refrigerador a 4°C.

Figura 15_ Kit de coleta citológico contendo escova endocervical e tubo com meio líquido.



FONTE: QGENE, 2011.

Toda a parte experimental foi realizada no laboratório DNA Consult Genética e Biotecnologia, sediado na Rua São Paulo nº 557, São Carlos-SP. A empresa conta com mais de 15 anos e é especializada na análise de DNA de origem humana e animal e na aplicação dos conhecimentos derivados destas análises nos mais diferentes ramos, como: paternidade, exames genéticos, diagnóstico e prognósticos. Com isso, ela disponibilizou toda a estrutura do laboratório, insumos e equipamentos para a realização desta pesquisa.

3.3. Extração do DNA

O DNA das amostras biológicas foi extraído utilizando dois protocolos. Em um primeiro momento foi utilizado o kit comercial *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* – Qiagen e posteriormente um protocolo adaptado de Powell; Gannon (2002).

3.3.1. Protocolo de extração de DNA utilizando o kit comercial *QIAamp® DNA Blood Mini Kit*.

Para melhor rendimento do protocolo de extração foram adicionados alguns passos anteriores para limpeza do material biológico evitando a inibição da proteinase K. Em um tubo de 1,5mL foram adicionados 500µL de material biológico,

o qual foi centrifugado por 5 minutos a 14.000rpm a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante era descartado. Com o auxílio de uma pipeta eram adicionados 500 µL de tampão TE (Tris-EDTA), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 14.000rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado novamente com o auxílio de uma pipeta e adicionado 800µL de água ultrapura autoclavada. A solução era homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 14.000rpm à temperatura ambiente. Posteriormente à centrifugação, o sobrenadante era descartado com o auxílio de uma pipeta e o protocolo se iniciava normalmente conforme as instruções do fabricante.

Após o passo de lavagem, eram adicionados 20µL de proteinase K (20mg/mL) e 200µL de tampão AL. Esta mistura era homogeneizada no vortex por 15 segundos e incubada no banho seco a 56°C por 30 minutos.

Posteriormente eram adicionados 200µL de etanol absoluto e homogeneizado em vortex por 15 segundos. Todo o conteúdo contido no tubo era transferido para a coluna de purificação do kit que era centrifugado a 8.000rpm durante 1 minuto. Em seguida, o dispositivo da coluna era removido do tubo e recolocado em um tubo novo, adicionado 500 µL do tampão AW1 (*Wash Buffer 1*) e centrifugado a 8.000rpm durante 1 minuto. Um novo processo de lavagem era repetido, o dispositivo da coluna era removido e recolocado em um tubo novo, era adicionado 500µL do tampão AW2 (*Wash Buffer 2*) e este material era centrifugado a 14.000rpm durante 3 minutos. Após a centrifugação, a coluna era colocada em um tubo novo e etiquetado, adicionando 50 µL de tampão de eluição (*AE*) e centrifugado por 2 minutos a 8.000rpm. Em seguida a coluna era descartada e a amostra contida no tubo podia ser armazenada à -20°C.

3.3.2. Protocolo adaptado de extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1).

Em um tubo de 1,5mL foram adicionados 500µL de material biológico o qual foi centrifugado por 5 minutos a 14.000rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante era descartado com o auxílio de uma pipeta. Eram adicionados 500 µL de tampão TE (Tris-EDTA), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 14.000rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado novamente com o auxílio de uma pipeta e adicionado 800µL de água ultrapura

autoclavada. A solução era homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 14000rpm à temperatura ambiente. Posteriormente à centrifugação o sobrenadante era descartado com o auxílio de uma pipeta e uma solução de lise era adicionada no tubo que continha:

- 240 µL de água deionizada;
- 80 µL de Tampão de Proteinase K, 5X (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mol/L EDTA e 0,5% SDS);
- 40 µL de SDS 10%;
- 20 µL da enzima Proteinase K (20 mg/mL).

Esta solução foi homogeneizada e incubada a 56°C *overnight*. Após a incubação foi adicionado 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), o material foi homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 14.000rpm. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, adicionado 1 volume de clorofórmio e homogeneizado. A solução foi centrifugada a 14.000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Em seguida foram adicionados 2,5 volumes de etanol P.A, 1/10 de Acetato de Sódio e a solução foi homogeneizada e colocada em freezer a -20°C por 2 horas. Após a precipitação do DNA a solução foi centrifugada a 14.000rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de Etanol 70% e o material foi centrifugado a 14.000rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, colocado para secar e o precipitado foi ressuspendido em 30µL de água ultrapura autoclavada ou T.E. (Tris-EDTA) e armazenado em freezer a -20 °C.

3.3.3. Quantificação do DNA extraído.

Para a quantificação do DNA total extraído das amostras, utilizou-se duas metodologias, a fluorometria e a eletroforese em gel de agarose. A fluorometria utilizou-se do equipamento Quantus®- Fluorometer Promega, com o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System, que quantifica amostras entre 0,2 a 400ng/µL seguindo as instruções do fabricante.

Para analisar a integridade e também quantificar o DNA obtido, foi utilizado a eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) corado com brometo de etídio - LGC (Ref13-8751-001). No primeiro poço do gel

era colocado um marcador de massa molecular *High DNA Mass Ladder* Invitrogen® e pela da comparação da coloração entre o marcador e as amostras era possível estimar a quantidade e integridade do DNA.

3.3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) – MY09/MY11

Foram realizadas reações duplex contendo a região híper variável do gene L1 do HPV e como controle da amplificação para verificar a presença de DNA foi utilizado a β -Globina. Os oligonucleotídeos da β -Globina geram um fragmento de 620pb e os oligonucleotídeos degenerados MY09/MY11 geram um fragmento de 450pb. As sequências utilizadas constam na tabela 5.

Tabela 5_ Sequências do oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR do gene da β -Globina e da região L1 do HPV (MY09/MY11).

Gene	Nome	Sequência dos <i>Primers</i> (5´-3´)	Tm (°C)	Tamanho (pb)
L1	MY09	5´CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC 3´	50	450
	MY11	5´GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3´	55	
B-Globina	B-Globina Forward	5´CCT GAG AGC TGG CTA GTG ATT 3´	54	620
	B-Globina Reverse	5´TAG TCC CAC TGT GGA CTA CTT 3´	54	

Fonte: Adaptado MANOS, 1989.

Legenda: M = A/C; R = A/G; W = A/T; Y = C/T

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador com gradiente de temperatura da *Applied Biosystems*®, modelo Veriti 96 *Well*. A reação foi constituída em um volume final de 15 μ L contendo: 1X de solução tampão (20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol); 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 mM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dATP – Promega Corp.); 10 pmols de cada um dos *primers* MY09, MY11 e 2pmol do *primers* β -Globina *Forward* e β -Globina *Reverse* (tabela 5); 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen®) e 2 μ L de DNA total (30 ng).

Em todas as séries de reações foi incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e o DNA era substituído por água além de um controle positivo de um DNA que continha o vírus do HPV.

O programa do ciclo térmico iniciou-se com uma fase de desnaturação a 95°C por 5 minutos, 50 ciclos de 95°C por 45 segundos (desnaturação da fita do DNA), 55°C por 45 segundos (anelamento dos *primers*), 72°C por 1 minuto (incorporação dos nucleotídeos) e seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos gerados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (USB UltraPure®) a 2%, preparada com 100 mL de tampão TAE e 1 µL de brometo de etídio - LGC em uma mini cuba horizontal (BioAgency®). No momento de aplicar no gel as amostras foram ressuspensas em tampão *Loading Buffer 6X* e a corrida foi conduzida a uma tensão de 80 V por 30 minutos. O tampão utilizado para a corrida foi o mesmo utilizado no preparo do gel.

Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador de U.V (UVP-BioResearch®) e os resultados registrados em um sistema de fotodocumentação e analisados pelo software Doc-It 3.0®.

Foram consideradas positivas para o vírus do HPV as amostras que apresentaram fragmentos de tamanho de 450 pb correspondentes à região L1 dos *primers* MY09/MY11 e 620 pb correspondentes à região β-Globina como controle interno. Já as amostras negativas não apresentavam amplificação do fragmento de tamanho de 450 pb correspondentes à região L1 dos *primers* MY09/MY11 e sim apenas à amplificação correspondente da β-Globina com 620pb.

3.3.5. Reação de Sequenciamento para genotipagem do HPV

Após confirmar quais amostras eram positivas para o HPV, realizou-se uma nova reação com apenas os *primers* MY09/MY11 para ser utilizada no sequenciamento. A reação, o ciclo térmico e a análise foram as mesmas citadas no item 3.3.4. Posteriormente, estes produtos da PCR eram purificados utilizando a enzima *ExoSAP-IT* (Affymetrix®) conforme descrito abaixo:

Em um tubo de 200µL foi adicionado 1µL da enzima *ExoSAP-IT* e 5µL do produto da PCR. Esta amostra era incubada por 37°C por 30 minutos (nesta etapa ocorre a degradação dos *primers* e dos nucleotídeos restantes) e 80°C por

15 minutos (desnaturação da enzima). Em seguida estas amostras eram quantificadas utilizando um gel de agarose e foi utilizado aproximadamente 20ng/μL na reação de sequenciamento.

Após a purificação, a reação de sequenciamento se utilizou o kit *DyEnamic ET Dye Terminator Cycle sequencing* (GE HealthCare) e o *primer* MY09 para reação *forward* e MY11 para reação *reverse* conforme instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram sequenciadas no sequenciador automático de DNA *MegaBace 1000 DNA Sequencer*. Em seguida foi realizada a análise das amostras utilizando o software Chromas 2.4 (Technelysium[©]) obtendo-se a sequências do DNA sequenciado (Arquivo fasta).

Ao final do procedimento as sequências eram comparadas em um banco de dados genético utilizando a ferramenta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) a fim de determinar os genótipos dos HPV.

3.3.6. Reação em cadeira da polimerase (PCR – Real time) – Utilizando SYBR-Green[®]

Para amplificação em PCR em tempo real utilizando SYBRGreen[®]. As amostras de DNA extraídos foram amplificadas empregando apenas os *primers* MY09/MY11 (descrito por Manos et al. (1989), tabela 5). Isso porque não é possível realizar reações multiplex nesta técnica.

Este experimento teve como objetivo a realização de um *screening* entre as amostras, uma vez que os *primers* MY09/MY11 são degenerados em algumas posições e assim, o anelamento é possível a mais de um tipo de nucleotídeo durante a reação da PCR e, com isso, amplificar mais de um genótipo do vírus.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador em tempo real, LineGene 9600 da empresa Bioer[®]. As reações foram constituídas em um volume final de 12,5 μL, contendo: 2x do tampão HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix (Affymetrix[®]), 10pmol do primer MY09 e 8pmol do primer MY11(dados da padronização dos *primers* não mostrados) e 2 μL de DNA total (20ng).

Todas as reações foram realizadas em duplicatas, sempre era incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e o

DNA era substituído por água, além de um controle positivo de um DNA que continha o vírus do HPV.

O programa do ciclo térmico iniciou-se com a fase de desnaturação a 95°C por 2 minutos, 42 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação da fita do DNA) e 60°C por 60 segundos (anelamento dos primers e a incorporação dos nucleotídeos), nesta fase também ocorria a leitura da fluorescência.

Ao final dos ciclos era realizada a curva de dissociação dos *primers* (curva de *melting*) que consistia na elevação da temperatura a partir de 70°C até 95°C. As leituras eram efetuadas a cada 0,5°C. Neste processo era possível determinar o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers*, assim era possível verificar a formação de um único produto, amostra positiva, ou se produtos inespecíficos também foram formados.

Em caso de resultado negativo para o PCR em tempo real utilizando os primers degenerados MY09/MY11, era realizado uma reação da PCR com os oligonucleotídeos para β -Globina (tabela 5) para verificar a presença de DNA.

Após a realização da reação, as amostras eram analisadas no software do equipamento LineGene9600 – FQD-96^a v1.0. Foram consideradas positivas para o vírus do HPV as amostras nas quais ocorria o aumento exponencial da curva de amplificação durante a PCR e também o valor entre 79,1°C até 81,5°C da *T_m* (ESCUTENAIRE et al.2006). Caso não houvesse aumento exponencial da curva de amplificação durante a PCR em tempo real, o valor do *T_m* diferente de 79,1°C até 81,5°C e apenas a β -Globina amplificasse o fragmento correspondente de 620pb ela era considerada negativa.

3.3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR – Real time) – Utilizando *TaqMan*[®]

Para realização da PCR em tempo real utilizando *Taqman*[®], as amostras de DNA foram amplificadas utilizando uma reação multiplex para cada genótipo do HPV, 16, 18 e 31, que correspondem a praticamente 80% dos cânceres cervicais em todo o mundo (MOLIJN et al., 2005).

Para isso foram realizadas reações multiplex contendo o *primers* específicos de cada genótipo do HPV (16, 18 e 31). Como controle interno de

reação β -Globina para verificar a presença de DNA. Na tabela 6 são apresentadas as seqüências dos *primers* utilizados neste trabalho.

Tabela 6_ Sequências dos oligonucleotídeos e *probes* utilizados para amplificação por PCR em tempo real para os HPV genótipo 16, 18 31 e a β -Globina.

Gene	Nome	Sequências dos Iniciadores (5'-3')	Concentração	Tamanho (pb)
E6	HPV16_Foward	5'GAA CCG AAA CCG GTT AGT ATA A 3'	5pmol	128
	HPV16_Probe	5'FAM -CAT TTT ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATG TTT C- BHQ1 3'	10pmol	
	HPV16_Reverse	5'ATG TAT AGT TGT TTG CAG CTC TGT 3'	5pmol	
E6	HPV18_Foward	5'GGA CCG AAA ACG GTG TAT ATA A 3'	5pmol	124
	HPV18_Probe	5'HEX-ATG TGA GAA ACA CAC CAC AAT ACT ATG GCG CG – BHQ1 3'	10pmol	
	HPV18_Reverse	5'CAG TGA AGT GTT CAG TTC GGT 3'	5pmol	
LRC	HPV31_Foward	5'GAA CCG AAA ACG GTT GGT ATA TA 3 3'	5pmol	144
	HPV31_Probe	5'CY5-CAT AGT ATT TTG TGC AAA CCT ACA GAC GCC ATG T -BHQ1 3'	10pmol	
	HPV31_Reverse	5'ATC GTA GGG TAT TTC CAA TGC 3'	5pmol	
β- Globina	β -Globina _Foward	5'ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3'	2pmol	110
	β -Globina _Probe	5'ROX TCA AAC AGA CAC CAT GGT GCA TCT GAC TCC – BHQ2 3'	5pmol	
	β -Globina _Reverse	5'CAA CTT CAT CCA CGT TCA C 3'	2pmol	

Fonte: Adaptado SCHMITZ et al., 2009.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador em tempo real, Line Gene 9600 da empresa Bioer®. As reações foram constituídas em um volume final de 20 µL, contendo: 2x do tampão TaqMan®2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), as concentrações dos *primers* para o HPV, 16, 18, 31 e a β-Globina que constam na tabela 6 (dados da padronização dos *primers* não mostrados) e 2 µL de DNA total (20ng).

Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Sempre foi incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e o DNA era substituído por água, além de um controle positivo de um DNA que continha o vírus do HPV.

O programa do ciclo térmico iniciou-se com uma temperatura de 50°C por 2 minutos, para atividade da enzima *AmpErase UNG* contida no kit, esta enzima remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. Em seguida ocorreu a desnaturação do anticorpo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa era realizado 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação da fita do DNA) e 60°C por 60 segundos (anelamento dos *primers* e a incorporação dos nucleotídeos), nesta fase também ocorria a leitura da fluorescência.

Ao final dos ciclos de amplificação as amostras eram analisadas no software do equipamento LineGene9600 – FQD-96^a v1.0. Foram consideradas positivas para o vírus do HPV, qual ocorria o aumento exponencial da curva de amplificação de um dos genótipos do HPV durante a PCR e também da β-Globina. Caso não houvesse aumento exponencial em nenhuma das curvas de amplificação, mas apenas a β-Globina apresentasse a curva o resultado, era considerado negativo para um dos três genótipos.

3.3.8. Genotipagem do vírus utilizando sequenciador de nova geração – Miseq Illumina

Para preparo da biblioteca de amostras foi utilizado o kit Nextera® XT DNA *Sample Preparation* e Nextera® XT Index (Illumina, San Diego-USA). Este kit permite sequenciar todo o DNA presente na amostra permitindo a identificação e a caracterização de todos microrganismos presentes no raspado do colo do útero. O sequenciamento foi realizado na plataforma Miseq (Illumina, San Diego-USA)

usando o *kit MiSeq Reagent v2 (300 cycle)* (instruções de preparo de biblioteca e do sequenciamento foram recomendadas pelo fabricante).

Em todas as corridas de sequenciamento realizadas foi adicionado, como controle interno, 5% de *Phix Control V3* (Illumina), uma biblioteca conhecida de um genoma viral pequeno PhiX (NCBI *Reference Sequence* NC_001422.1), proporcionando uma diversidade entre as bases de nucleotídeos (45% GC e 55% AT), um controle de qualidade para geração de cluster e na geração da matriz.

O *workflow* utilizado foi a geração de arquivos FASTAQ somente, usando a estratégia *Pared End*, sequenciando ambas extremidades de um fragmento, gerando dados de sequenciamento alinháveis e com alta qualidade. Os parâmetros de qualidade da corrida foram os mesmos recomendados pela Illumina na utilização do *kit MiSeq Reagent v2 300 cycle (2x150pb)*.

Após o sequenciamento, os arquivos de saída do sequenciamento apresentavam o formato FASTQ, primeiramente realizou-se uma filtragem dos dados, utilizando o software FASTQC® *BaseSpace Labs* Illumina, que oferece de forma rápida um conjunto de análises, que verifica a qualidade das bases obtidas e seus dados apresentam algum problema pelo *Phred quality score (Q score)*

Posteriormente as amostras eram submetidas no software *PathSeq virone (BaseSpace Labs Illumina)* que automaticamente identificava e caracterizava o genoma do vírus, através do seu banco de dados que possui mais de 50 mil genomas clinicamente relevantes e um controle de qualidade para falsos positivos. O software gerava um relatório em pdf a partir dos dados gerados, em pouco menos de uma hora, identificando as forças dos genomas globais correspondentes, fornecendo uma pontuação de confiança para o vírus identificado relacionado aos genomas encontrado no banco de dados. Caso houvesse mais de um vírus presente na mesma amostra eles eram combinados no mesmo relatório com o vírus de maior prevalência em cima.

Foram consideradas amostras positivas para o vírus do HPV as que apresentavam um score, pontuação de confiança para o vírus identificado, acima de 3 pontos (adequado). Amostras que apresentaram score abaixo de 2 ou não identificado, eram consideradas negativas sem a presença do vírus.

4. RESULTADOS

No total foram coletadas 318 amostras biológicas de raspado de colo cervical em mulheres. A extração do DNA foi possível em 316 amostras. Dois casos (amostra 59 e 99) não havia material no tubo e elas foram descartadas do estudo. No primeiro momento, a identificação do vírus do HPV foi realizada pela técnica de PCR seguida pelo sequenciamento Sanger (316 amostras). No início de 2014 o laboratório adquiriu um PCR em tempo real e iniciaram os testes com os reagentes SYBRGreen® e Taqman® (30 amostras). Em 2015 a DNA Consult adquiriu um sequenciador de nova geração *Miseq* Illumina, e foram realizadas duas corridas (4 amostras), mostrando a viabilidade da técnica, contudo, novos testes devem ser realizados.

No final do projeto obtivemos 65 amostras positivas para o vírus do HPV testadas por diferentes técnicas moleculares como exemplificado na tabela 7.

Tabela 7_ Resultados obtidos para identificação do vírus do HPV.

Amostra	Genótipos do HPV	Metodologia
DNA003	X	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan
DNA006	16	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan
DNA009	71	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA012	70	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA014	53	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA015	58	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA018	45	Sanger/ SYBRGreen®/
DNA023	61	Sanger/
DNA027	31	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan/SNG
DNA042	X	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan
DNA049	16	Sanger/
DNA050	45	Sanger/
DNA053	X	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan
DNA054	X	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan
DNA056	58	Sanger/
DNA060	66	Sanger/
DNA061	82	Sanger/
DNA063	X	Sanger/SYBRGreen®/TaqMan

DNA064	16	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA077	16	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA081	58	Sanger/
DNA082	53	Sanger/
DNA095	85	Sanger/
DNA105	62	Sanger/
DNA106	58	Sanger/
DNA119	81	Sanger/
DNA124	18	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA127	66	Sanger/
DNA129	53	Sanger/
DNA137	X	Sanger/
DNA148	31	Sanger/ TaqMan /SNG
DNA155	53	Sanger/
DNA158	58	Sanger/
DNA 163	16	Sanger/ TaqMan
DNA 172	58	Sanger/
DNA 173	18	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA 183	X	Sanger/ TaqMan
DNA 187	X	Sanger/ TaqMan
DNA 188	X	Sanger/ TaqMan
DNA 189	31	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan/
DNA 201	16	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA 210	33	Sanger/
DNA 212	X	Sanger/
DNA 220	X	Sanger/
DNA 225	33	Sanger/
DNA 235	X	Sanger/
DNA 237	16	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA 239	71	Sanger/
DNA 243	16	Sanger/ SYBRGreen®/TaqMan
DNA 249	16	Sanger/ TaqMan
DNA 253	58	Sanger/
DNA 263	16	Sanger/ TaqMan
DNA 266	35	Sanger/ SYBRGreen®/SNG
DNA 267	X	Sanger/
DNA 271	16	Sanger/ TaqMan
DNA 282	X	Sanger/
DNA 283	X	Sanger/

DNA 286	18	Sanger/ TaqMan
DNA 290	33	Sanger/
DNA 304	53	Sanger/
DNA 311	16	Sanger/ TaqMan
DNA 313	33	Sanger/
DNA 316	16	Sanger/ TaqMan
DNA 317	X	Sanger/
DNA 318	33	Sanger/

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: Resultados obtidos para identificação do vírus do HPV, testando diferentes técnicas de biologia molecular. PCR Convencional com sequenciamento Sanger, PCR em tempo Real utilizando a química SYBRGreen®, PCR em tempo Real utilizando a química Taqman® e Sequenciamento de Nova Geração (SNG). X= Amostras que não foram identificadas pela técnica de PCR convencional seguida por sequenciamento Sanger. Podendo ser mais que um genótipo do vírus.

Existem inúmeros trabalhos descritos na literatura para extrair o DNA de amostras biológicas. Neste estudo testou-se duas metodologias de extração de DNA, um kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit – Qiagen* e um protocolo adaptado de Powel e Gannon (2002) *in house*. Sendo realizado um comparativo entre as duas técnicas quanto a rapidez, qualidade e quantidade de DNA extraído, qualidade das amplificações, custo da extração e degradação ao longo do tempo, como indicado na tabela 8.

Tabela 8_ Protocolos utilizados para extração do DNA de raspados de colo cervical com as variáveis testadas.

Variáveis	Protocolos de extração utilizados	
	Powel, Gannon, 2002.	Kit <i>QIAamp DNA Blood</i>
Referências	Powel, Gannon, 2002.	Kit <i>QIAamp DNA Blood</i>
Tempo de extração do DNA	15 horas	45 minutos
*Qualidade do DNA	Boa	Muito Boa
Quantidade do DNA obtido	20ng/μL	25ng/μL
**Degradação ao longo do tempo	Média	Lenta
***Custo da extração	Médio (R\$5,00)	Alto (R\$25,00)
Foi possível à amplificação	Sim	Sim

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: Variáveis testadas: *de acordo com a possibilidade de amplificação; **degradação: lenta até 30 dias - média até 15 dias e rápida 48 horas a -20°C; ***somente o custo dos reagentes.

O protocolo adaptado de Powel e Gannon (2002) *in house* apresentou bons resultados quanto à qualidade e quantidade de DNA extraído, a degradação do DNA foi média e o custo relativamente baixo. Mas a dificuldade neste protocolo está no longo tempo para obtenção do DNA.

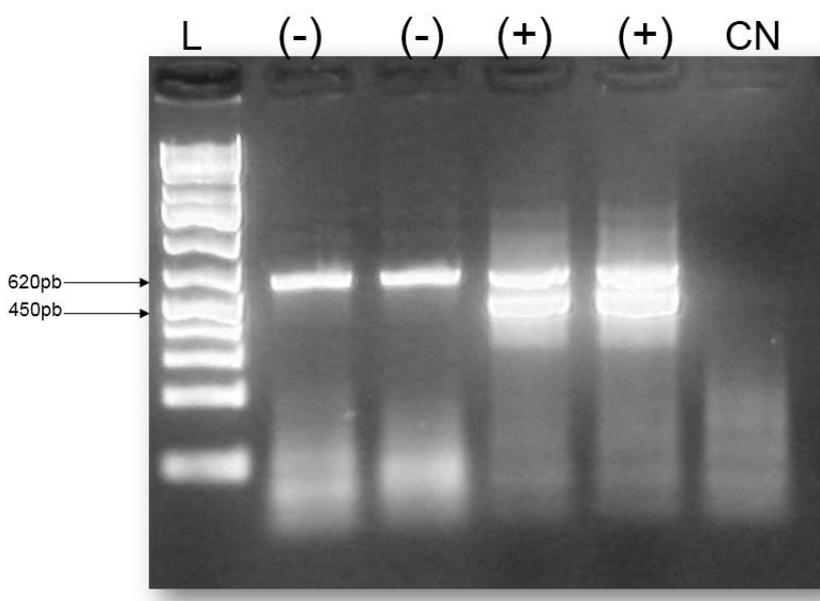
Já o kit comercial *Qiamp Blood Mini Kit* da Qiagen apresentou os melhores resultados, o tempo de extração baixo, a quantidade e qualidade do DNA eram boas e a degradação do DNA foi lenta. A desvantagem é o custo elevado de aproximadamente R\$ 25,00 por amostra.

4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pelo sequenciamento Sanger.

A técnica da PCR utilizando o MY09/MY11 seguida pelo sequenciamento já é muito utilizada para realização da genotipagem do vírus do HPV.(IFTNER, VILLA, 2003; MANOS, 1989). Como ponto de partir foi utilizado o protocolo descrito por Mano et al. (1989), sendo adaptado com a introdução de mais um conjunto de oligonucleotídeos a β -Globina que gera um fragmento correspondente a 620pb servindo como controle interno da reação.

Na figura 16 é apresentado um gel representativo da amplificação multiplex para identificação do vírus do HPV. Observa-se amplificação do fragmento do gene L1 (MY09/MY11) com aproximadamente 450pb com a β -Globina.

Figura 16_ Eletroforese em gel de agarose.

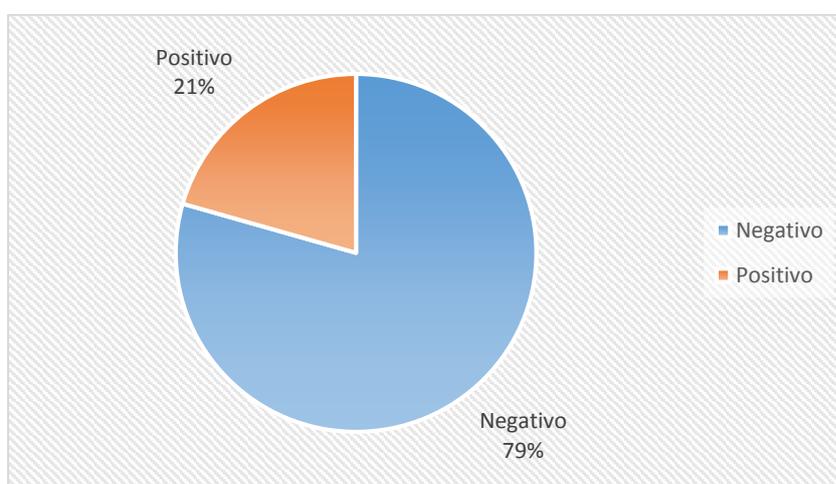


Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio utilizado para o diagnóstico do HPV. Amplificação por PCR com os oligonucleotídeos MY9/MY11 gerando um fragmento de 450pb, e da β -Globina gerando fragmento de 620pb. L = Ladder 1kb Plus (*Invitrogen*), CN = Controle Negativo sem a presença de DNA, (+) = amostra com HPV amplificadas com MY9/MY11, (-) = amostras sem HPV que amplificou apenas o controle interno β -Globina.

Depois das padronizações iniciais, os resultados obtidos foram constantes e reprodutíveis dentro do grupo pesquisado, com isso foi possível identificar 65 casos positivos para a presença do DNA do HPV, o restante das pacientes não apresentavam presença do DNA viral em suas amostras. Estas amostras positivas foram separadas das restantes para posterior análise de sua tipagem, ver gráfico 1.

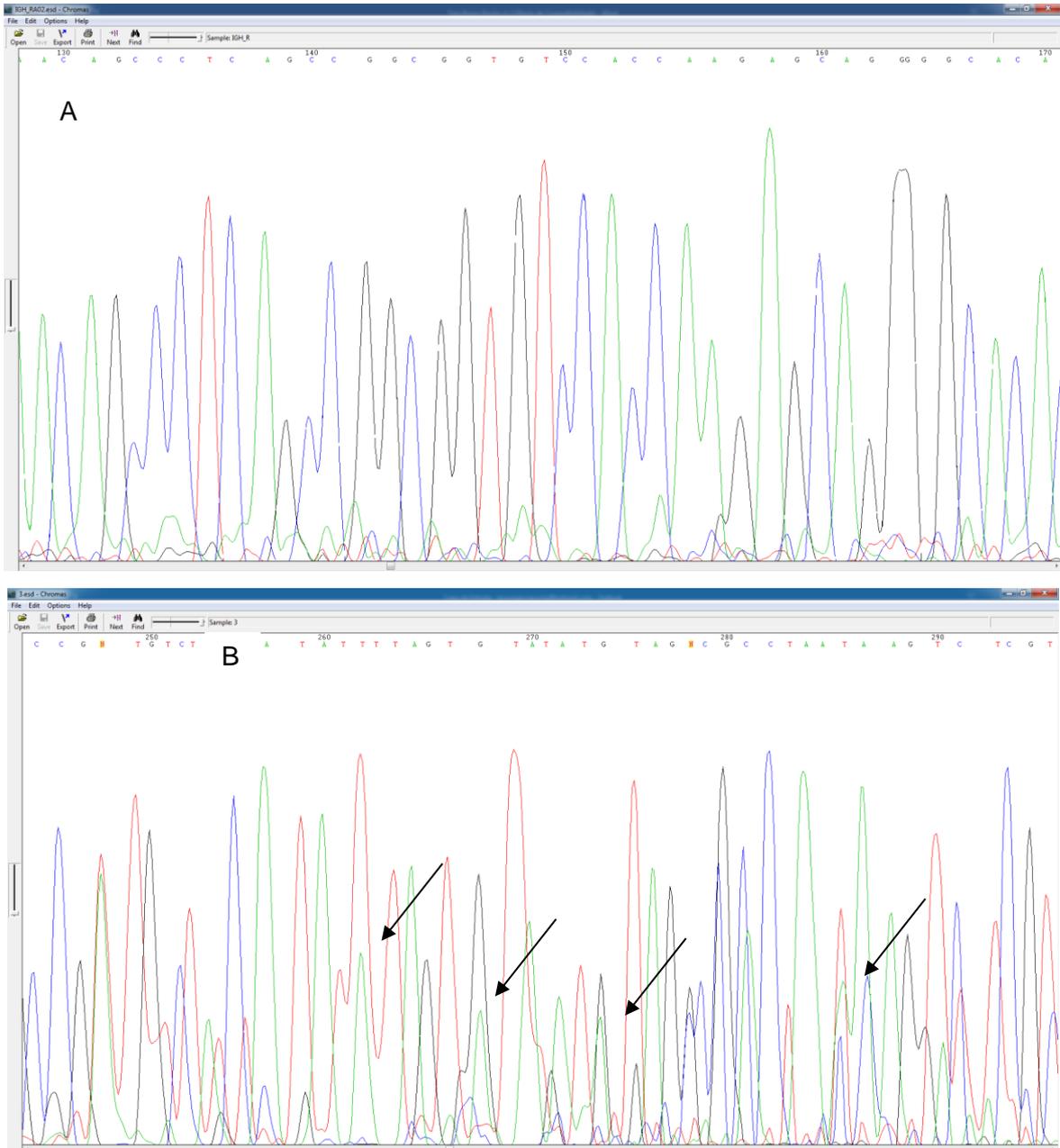
Gráfico 1_ Proporção de casos positivos e negativos na população estudada.



Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Após a identificação das amostras positivas para o HPV, foram realizados os primeiros testes para genotipagem do vírus utilizando o sequenciamento Sanger (dados não mostrados). Depois da padronização e da reprodutibilidade nos experimentos foram realizados os sequenciamentos dos produtos amplificados. O genótipo viral foi identificado em 49/65 (75,3%) dos casos de amostras positivas. Em 24,7% (16 amostras) das amostras não foram possíveis identificar o genótipo do HPV, pois havia uma co-infecção de dois ou mais tipos de vírus. Na figura 17 é possível ver um exemplo de eletroferograma referente ao sequenciamento do fragmento do gene L1 do vírus do HPV.

Figura 17_ Eletroferograma parcial da sequência de DNA obtida do *Amplicon* de 450pb (MY09/MY11) analisado pelo software Chromas 2.4 (Technelysium©) gerado pelo sequenciador automático capilar MegaBace1000 (Ge HeathCare).



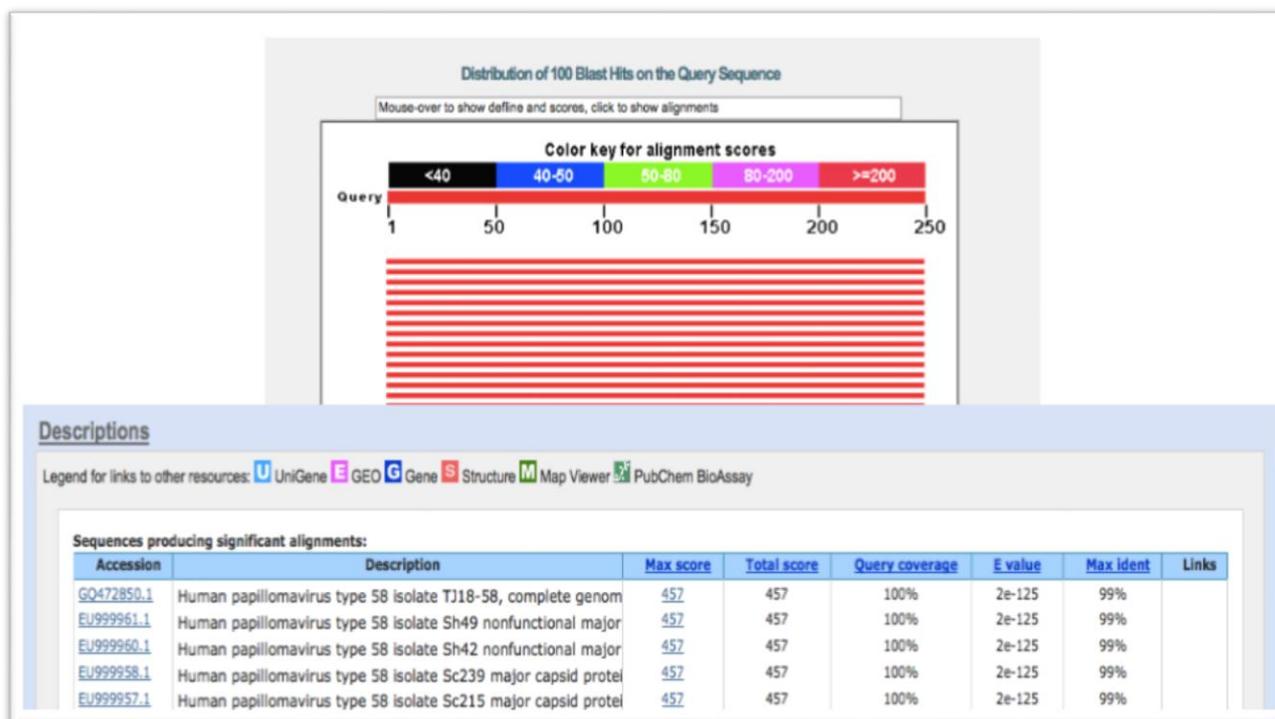
Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: A- Infecção simples, sequência de nucleotídeos correspondente HPV58. B- Infecção múltiplas, com sobreposição das sequências nucleotídeos do vírus. Não sendo possível a identificação.

Após a análise para verificar a qualidade dos eletroferograma e extração das sequências do DNA (arquivo fasta) as sequências obtidas foram comparadas em um banco de dados online do BLAST do NCBI que continha milhares de sequências de DNAs do HPV já descritas. Desta maneira foi possível

identificar os diversos genótipos de HPV encontrados nas amostras. Em todos os resultados no software BLAST do NCBI foram obtidos os níveis mínimos de similaridade, variando entre 97% a 100%, como mostra a figura 18.

Figura 18_ Exemplo do resultado da busca por similaridade utilizando o software BLAST do NCBI.

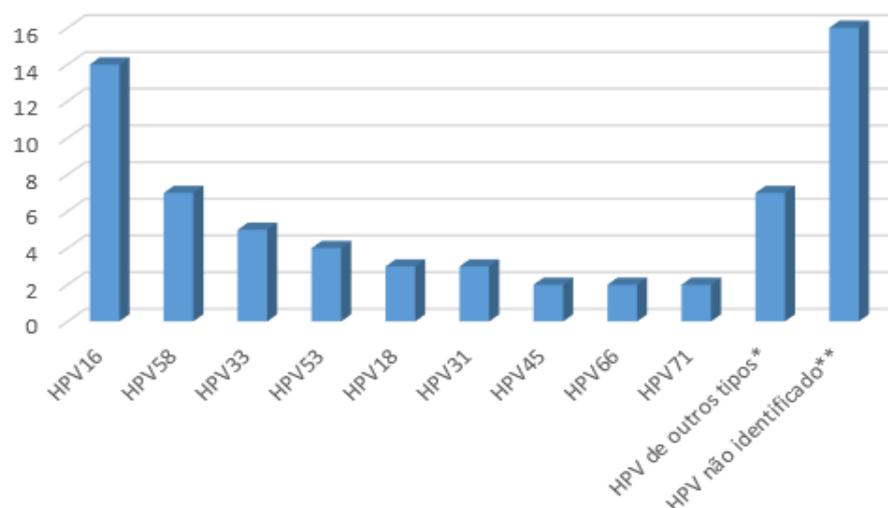


Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: O fragmento do DNA sequenciado (*Query*) demonstrou um nível de similaridade de 99% pareando com o genoma do HPV 58 do banco de dados.

Foram identificados os genótipos do HPV em 75% das amostras positivas. Em alguns casos, quando não havia similaridade no banco de dados possivelmente seria a presença de mais de um genótipo do HPV. Os HPV16, HPV58, HPV 33 foram os que apresentaram maior incidência entre as amostras. No gráfico 2 pode-se perceber a distribuição viral dos genótipos do HPV encontrados nas amostras de raspado cervical.

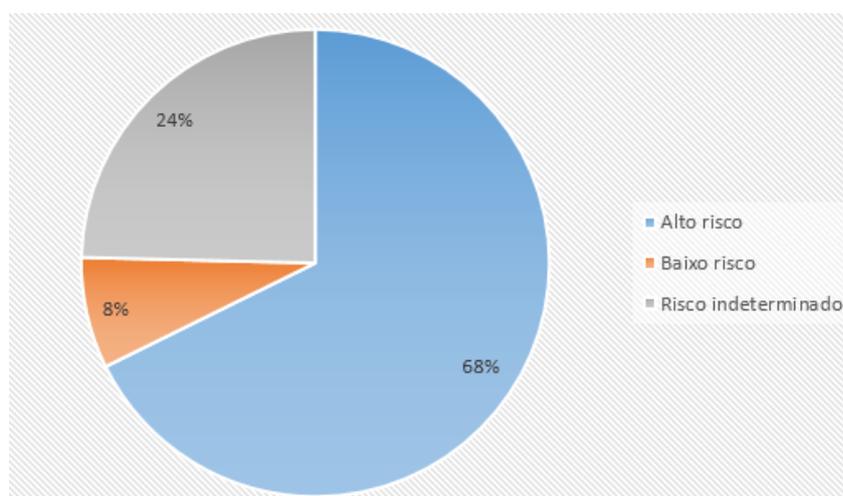
Gráfico 2_ Distribuição dos genótipos encontrados



Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Foram identificados 16 genótipos distintos de HPV:16, 58, 33, 53, 18, 31, 45, 66, 35, 70, 82, 85, 71, 81, 61 e 62 no estudo. Entre as amostras 68% (44 amostras) apresentavam alto risco oncogênico, 8% (5 amostras) são classificados como baixo risco e em 24%(16 amostras) apresentavam risco indeterminado. O gráfico 3 mostra a distribuição dos genótipos do HPV encontrados de acordo com o potencial oncogênico descrito na literatura.

Gráfico 3_ Proporção dos genótipos de alto, baixo risco oncogênico e risco indeterminado.



Fonte: Dados de pesquisa do autor.

4.2. PCR em tempo real (Real Time PCR)

4.2.1. SYBR Green®

A técnica de PCR em tempo real utilizando SYBR Green®, utilizou como ponto de partida os *primers* descritos por Manos (1989) (MY09/MY11). A partir disso foram realizados testes iniciais para determinar qual era a concentração ideal dos *primer*, temperatura de anelamento dos *primer*, a avaliação do *Ct* em que ocorreu a detecção da positividade da amostra e o valor do *Tm* (curva de melting) dos produtos da PCR.

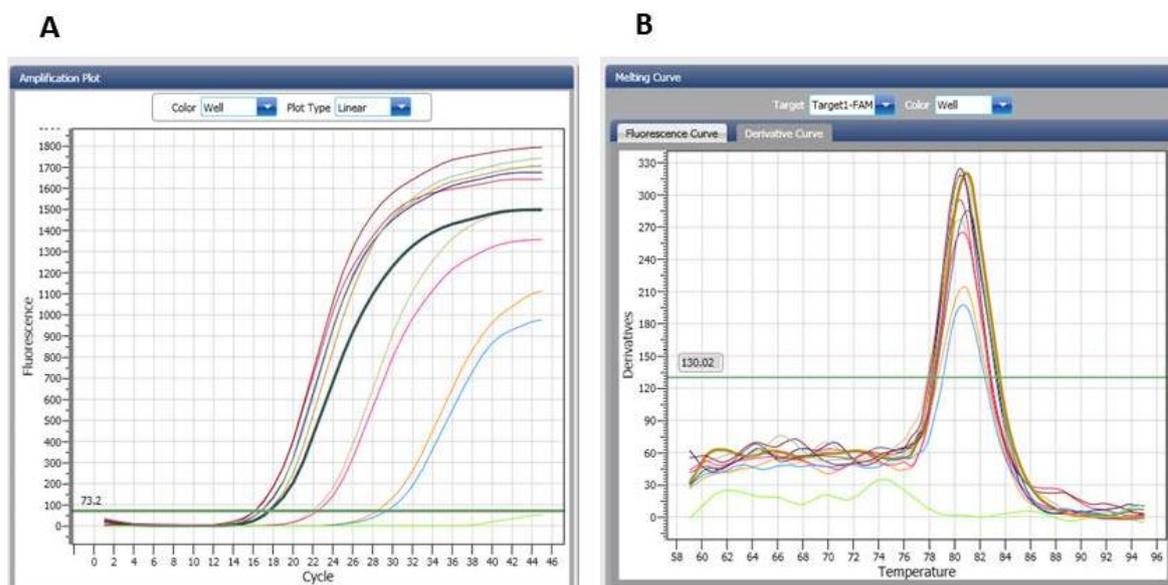
Após a padronização foi realizado uma seleção aleatória contendo 30 amostras (positivas e negativas). Os resultados da técnica da PCR em tempo real utilizando o SYBR Green® em 28 amostras corroboram com os resultados da PCR convencional identificando as mesmas amostras, mas em dois casos ocorreram amplificação. Estas amostras foram extraídas do DNA novamente e realizado um novo PCR para comprovar o resultado que se repetiu, conforme a tabela 9 e o gráfico 4.

Tabela 9_ Resultado obtido utilizando PCR em tempo real

Amostra	Resultado Sanger	Resultado SYBR Green®	Amostra	Resultado Sanger	Resultado SYBR Green®
DNA001	Negativa	Negativa	DNA016	Negativa	Negativa
DNA002	Negativa	Negativa	DNA017	Negativa	Negativa
DNA003	Positiva	Positiva	DNA018	Positiva	Positiva
DNA004	Negativa	Positiva	DNA019	Negativa	Positiva
DNA005	Negativa	Negativa	DNA020	Negativa	Negativa
DNA006	Positiva	Positiva	DNA021	Negativa	Negativa
DNA007	Negativa	Negativa	DNA022	Negativa	Negativa
DNA008	Negativa	Negativa	DNA023	Positiva	Positiva
DNA009	Positiva	Positiva	DNA024	Negativa	Negativa
DNA010	Negativa	Negativa	DNA025	Negativa	Negativa
DNA011	Negativa	Negativa	DNA026	Negativa	Negativa
DNA012	Positiva	Positiva	DNA027	Positiva	Positiva
DNA013	Negativa	Negativa	DNA028	Negativa	Negativa
DNA014	Negativa	Negativa	DNA029	Negativa	Negativa
DNA015	Positiva	Positiva	DNA030	Negativa	Negativa

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Gráfico 4_ PCR em tempo real com a química SYBR Green® para identificação do vírus do HPV utilizando os primer MY09/MY11.



Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Legenda: A- Curva de amplificação das amostras contendo o vírus HPV, com C_t variando entre 16 a 30. As amostras com C_t 16 apresentavam maior concentração em relação ao C_t 30. B. Curva de dissociação (T_m) das amostras contendo o vírus HPV, neste caso apresentaram valor médio de $80,4^\circ\text{C}$

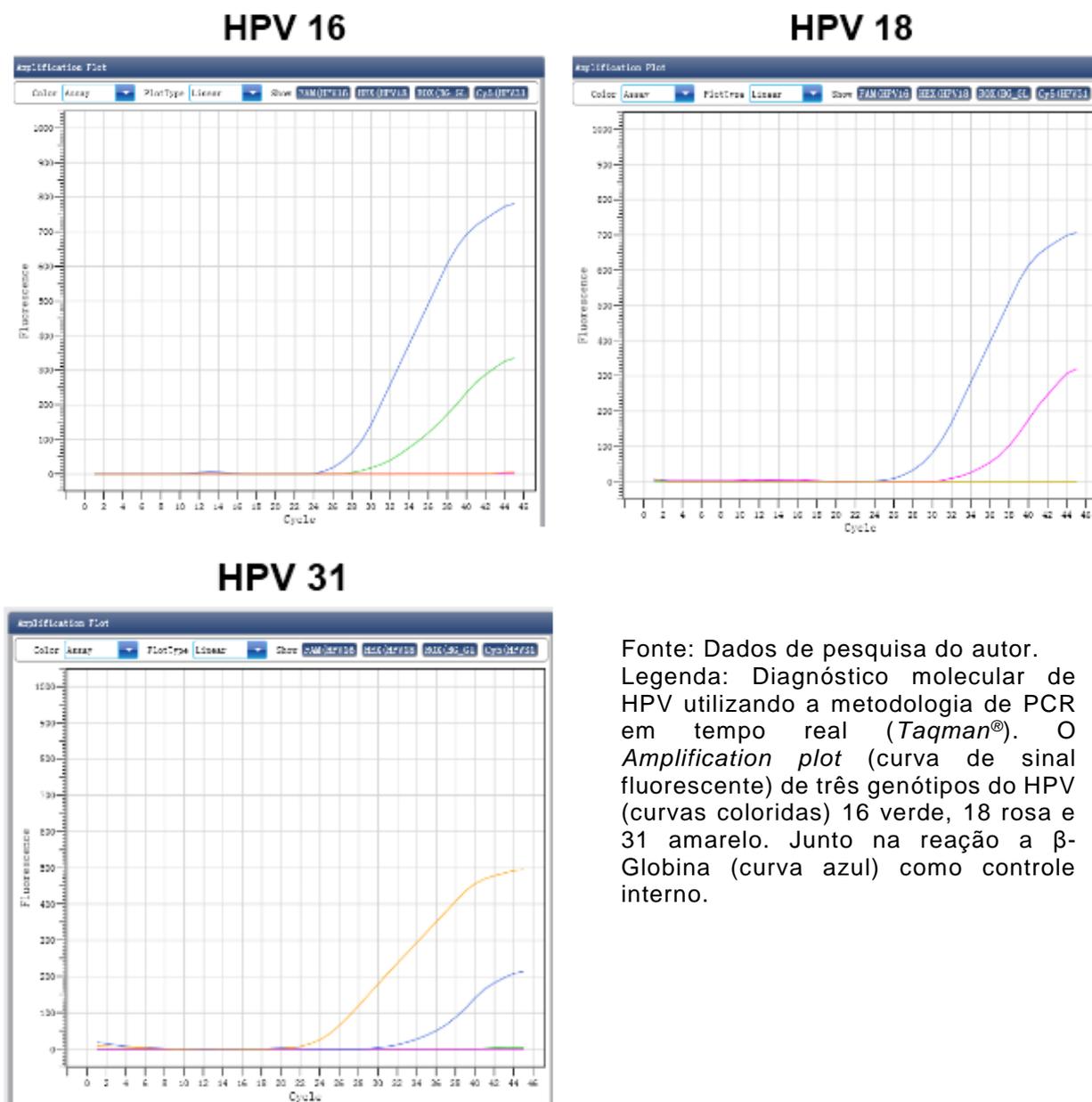
4.2.2. *Taqman*®

A técnica de PCR em tempo real utilizando *Taqman*®, teve como ponto de partida os *primers* descritos por Schmitz et al (2009) que amplificaria os HPVs de genótipos 16, 18, 31 e a β -Globina em uma única reação multiplex. A partir deste estudo foram realizados teste iniciais para determinar a concentração ideal do *primer* e *probe*, a temperatura de anelamento e a avaliação do C_t em que ocorria a detecção da positividade da amostra.

Após a padronização foi realizado uma seleção aleatória contendo 21 amostras (positivas e negativas), os resultados da técnica da PCR em tempo real utilizando *Taqman*® corroboram com a PCR convencional seguido do sequenciado do seu produto, obtendo os mesmos resultados em suas genotipagens.

O gráfico 5 mostra um exemplo do resultado obtido utilizando o PCR em tempo real com a química *Taqman*®.

Gráfico 5_ Diagnóstico molecular de HPV utilizando a metodologia de PCR em tempo real (*Taqman*[®]).



Fonte: Dados de pesquisa do autor.
 Legenda: Diagnóstico molecular de HPV utilizando a metodologia de PCR em tempo real (*Taqman*[®]). O *Amplification plot* (curva de sinal fluorescente) de três genótipos do HPV (curvas coloridas) 16 verde, 18 rosa e 31 amarelo. Junto na reação a β -Globina (curva azul) como controle interno.

4.3. Genotipagem do vírus utilizando sequenciador de nova geração – *Miseq Illumina*[®]

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas quatro amostras de DNA de raspado cervical para utilização do sistema de sequenciamento de nova geração. Para isso utilizou-se o kit Nextera XT Illumina[®], que realiza a fragmentação do DNA e simultaneamente adiciona os adaptadores em uma única reação em menos de

90 minutos. Além disso ele possui um processo de normalização eliminando o passo de quantificação da biblioteca.

No total foram realizadas duas corridas de sequenciamento no equipamento *Miseq*[®] Illumina utilizando o kit v2 300 ciclos (2x 150pb), os valores obtidos como parâmetros foram adequados e dentro das recomendações da empresa Illumina para o kit especificado. A tabela 10 mostra os parâmetros obtidos nos sequenciamentos.

Tabela 10_ Parâmetros obtidos nos sequenciamentos utilizando *Miseq* Reagente Kit v2, 300 cycle (2x150pb).

Parâmetros do Sequenciamento	Valores recomendados pelo fabricante	Corrida 01	Corrida 02
Densidade de clusterização (K/mm ²)	865-965	1000,0	953,0
Rendimento (Gb)	4,5-5,1	6,1	5,4
Reads Passing Filter (M)	12-15	19,74	17,11
Score de Qualidade (% acima de Q30)	80,0	89	93,7
Phix alinhado(%)	5,0	3,83	4,53

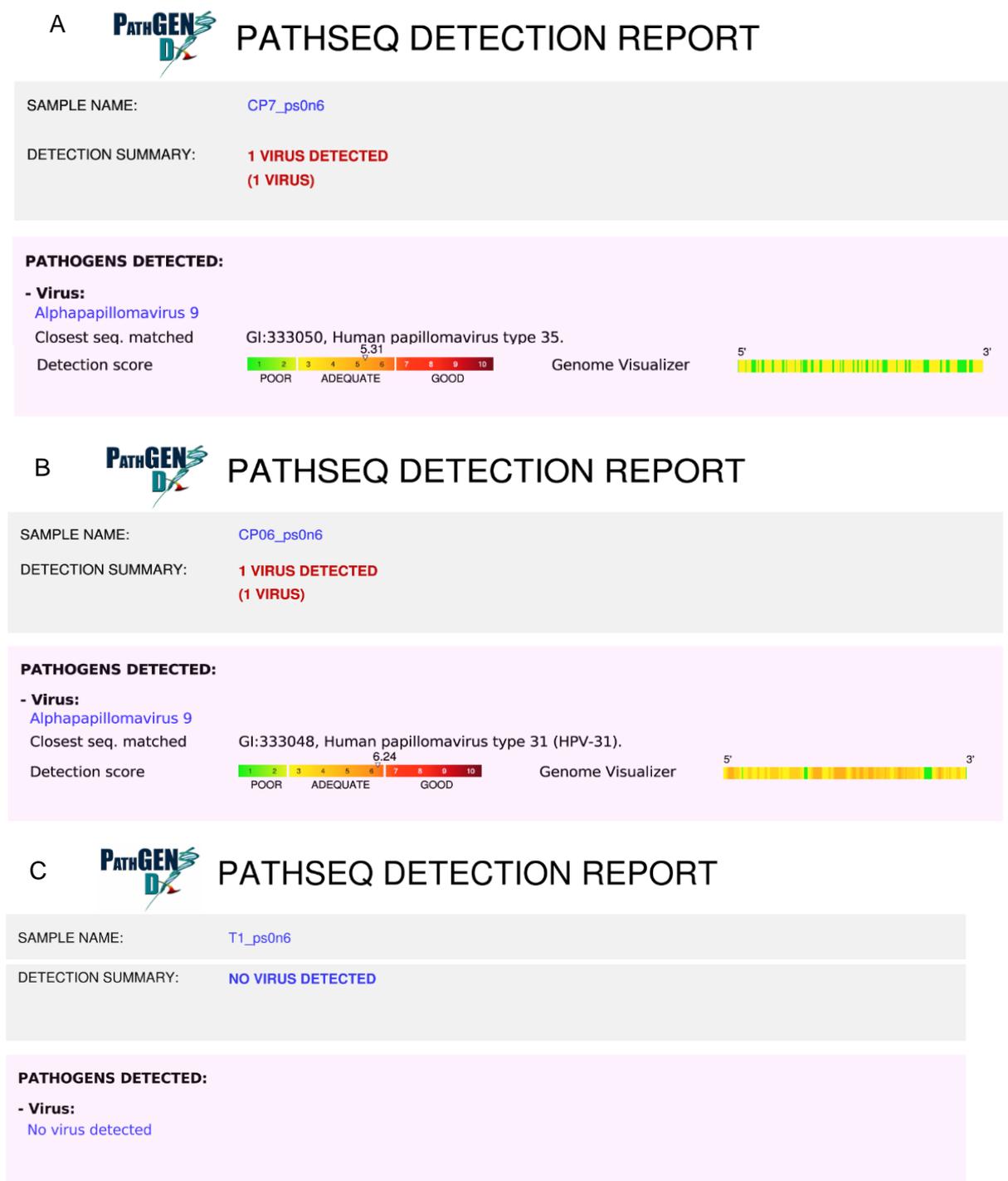
Fonte: http://www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.html

Legenda: K/mm² = 1000 cluster por mm²; pb = pares de base; Mb = megabases; Gb = gigabases; M = milhões.

Após obter os arquivos FASTQ, as amostras foram submetidas em um software online FASTQC[®] BaseSpace Labs Illumina, nele foi possível verificar a qualidade das bases obtidas pelo *Phred quality score* (Q score). Nas quatro amostras sequenciadas obtivemos resultados acima de Q30, que significa a probabilidade de uma base ser anotada incorretamente em 1000, uma precisão de anotação de uma base de 99,9%.

Em seguida, as amostras foram submetidas ao software *PathSeq virone* (BaseSpace Labs Illumina[®]) que automaticamente identificou e caracterizou o genoma do vírus enviando um relatório com os dados gerados sobre a amostra. As amostras positivas apresentavam score (pontuação de confiança para o vírus identificado) acima de 3 pontos (adequado). Amostras que apresentavam score abaixo de 2 ou não identificando eram consideradas negativas sem a presença do vírus, como na figura 19.

Figura 19_ Relatório gerado pelo software Pathseq- Virone para identificação do vírus do HPV.



Fonte: dados de pesquisa do autor.

Legenda: A- Amostras positivas para o HPV 35, com Score de 5,31. B- Amostra positiva para o HPV 31, com Score de 6,34. C- Amostra negativa para o vírus do HPV.

5. DISCUSSÃO

O Papilomavírus humano é um vírus de DNA capaz de infectar a pele ou as mucosas, ela é uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis em todo o mundo sendo que a grande maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terá contato com o vírus durante algum momento da vida. Existem mais de 120 genótipos de HPV atualmente, mas ao menos 30 genótipos que infectam a região anogenital. Sua infecção tem sido associada diretamente com o câncer de colo uterino em mulheres, a presença de algum genótipo de HPV é encontrada em cerca de 95% destes casos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as principais estratégias para a detecção de um câncer de colo uterino são o diagnóstico precoce e os métodos de rastreios eficientes. Programas organizados podem reduzir a incidência e a taxa de mortalidade, como ocorreu em países desenvolvidos após sua adoção a partir de 1950 e 1960.(INCA, 2016b)

O método principal e mais utilizado para rastreio é o exame citopatológico (teste Papanicolau), caso a cobertura da população-alvo chegue ao mínimo a 80%, e a garantia de diagnóstico e tratamento adequado dos casos alterados é possível reduzir em média de 50 a 80%. Em países desenvolvidos como Finlândia, Suécia, Dinamarca e Islândia que adotaram estes programas o índice de câncer cervical caiu mais de 50% (GUSTAFSSON et al., 1997). Contudo, em países em desenvolvimento os programas de rastreio até existem, mas apresentam falhas, desde qualidade e acesso ao tratamento que são insuficientes, com isso as taxas de câncer de colo do útero permanecem altas (CASTLE et al., 2004; KITCHENER, CASTLE, COX, 2006).

No Brasil a metodologia de rastreamento recomenda pelo Ministério da Saúde também é o exame citopatológico, prioritariamente em mulheres de 25 a 64 anos para o controle do câncer cervical. Contudo, o exame tem sido alvo de críticas devido a altas taxas de resultados falsos negativos e falsos positivos.

Pinho (2002) afirma que a taxa bruta de concordância deste tipo de exame foi de 65,1%. A sensibilidade do exame foi de 96%, mas a sua especificidade foi baixa 51,5%, significando a inclusão de muitos resultados falsos positivos (48,4%) e a de falso negativo (4%).

Em um estudo realizado por Rama et al (2008), com 5.485 mulheres nas cidades de São Paulo e Campinas, mostrou-se que 86,5% das pacientes com alterações citológicas e 92,8% das alterações histológicas haviam feito exame citopatológico anterior em período inferior a três anos, o que sugere a ocorrência de resultados falsos negativos nos exames anteriores.

Apesar de seu sucesso a citologia tem limitações sendo mais importantes os resultados falso-negativos. Grande parte destes resultados são atribuíveis à baixa quantidade de material biológico coletado e erros na preparação e interpretação das lâminas. Os resultados falsos-negativos são mais preocupantes que os falsos-positivos, já que as mulheres com este genótipo de diagnóstico serão perdidas do rastreamento e permanecerão com risco de desenvolver o câncer.(NONNENMACHER, BREITENBACH, 2002; RAMA et al., 2008). Além disso, os resultados falsos-negativos têm implicações médicas, financeiras e legais importantes; o último é um enorme problema nos Estados Unidos, onde erros de citologia falso-negativos são uma razão principal para litígio de negligência médica (MCCRORY et al., 1999; FRANCO, DUARTE-FRANCO, FERENCZY, 2001)

Com isso os testes moleculares vêm a suprir esta deficiência dos resultados falso-negativos e possibilitando a identificação e o genótipo do vírus. Uma revisão de 14 estudos realizado por Villa e Denny (2006), mostrou que a sensibilidade média e a especificidade dos testes citológicos foram de 60% e 95% respectivamente, enquanto os testes moleculares foram de 85% e 84%. Em média, a sensibilidade dos testes moleculares foram 27% maior que dos citológicos, em termos absolutos.

Portanto, a principal característica do presente estudo é a aplicação de técnicas moleculares para a identificação do HPV em amostras biológicas de raspado do colo do útero.

A coleta e o armazenamento do material biológico foram realizadas utilizando-se um kit específico para coletas de raspado de colo uterino (kit de coleta citológico de DNA – QGene – São Carlos - Brasil), tendo se mostrado eficiente, preservando o material até 4 anos após as coletas e demonstrou alta reprodutibilidade nas duas metodologias de extração testadas.

Na literatura existem inúmeros protocolos para a obtenção do DNA do HPV em amostras de raspado de colo cervical (DUNN et al., 2007; BOBEK et al., 2010) todos eles apresentam vantagens e desvantagens. Para este trabalho foram

utilizados dois protocolos: um kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit – Qiagen* que é amplamente utilizado em laboratórios clínicos e um protocolo *in house* adaptado de Powel e Gannon (2002).

O protocolo adaptado de Powel e Gannon (2002) foi escolhido para esta pesquisa, apesar de apresentar tempo de extração maior e utilizar reagentes que necessitam cuidados especiais, o custo da extração do DNA influencia em muito a continuação deste projeto. Inicialmente eram 316 amostras, com custo total para extração, utilizando o kit comercial da Qiagen, de aproximadamente R\$ 7.500,00. Desta forma, optou-se pela utilização do protocolo de extração adaptado de Powel e Gannon, 2002 (*in house*).

Caso este exame seja adotado por algum laboratório em sua rotina o protocolo comercial é o mais recomendado, devido à sua praticidade, por ser constituídas de poucas etapas, evitando a troca de amostras, tempo de extração rápido e o valor do kit de extração poderá ser incorporado no custo final do exame.

Existem inúmeras técnicas de biologia molecular para identificação do DNA do HPV, como por exemplo a hibridização *in situ*, Southern *Blot*, PCR e Captura Híbrida. A grande vantagem destas técnicas são sua alta sensibilidade, possibilitando identificar diferentes genótipos de HPV, principalmente os de alto risco oncogênico. Estes tipos de testes podem ser usados em grande variedade clínica, incluindo triagem primária de mulheres com mais de 30 anos, como auxiliar para os testes citológicos, na triagem de mulheres cujos resultados citológicos foram equivocados ou ainda no tratamento pós-câncer de colo do útero (CARMO, FIORINI, 2007).

Um dos métodos mais utilizados para genotipagem do HPV é a PCR, por isso os grandes números de estudos clínicos e epidemiológicos descritos na literatura (MOLIJN et al., 2005; CARMO, FIORINI, 2007; GRAVITT et al., 1998; MOYA et al., 2006).

No presente estudo, a metodologia da PCR e suas variações foram utilizadas para a genotipagem do HPV junto com uma nova técnica promissora, a de sequenciamento de nova geração.

Estão descritos na literatura inúmeros ensaios de PCR com diferentes oligonucleotídeos, tipos específicos ou gerais que amplificam um amplo espectro de genótipos do HPV (MANOS, 1989; WALBOOMERS et al., 1999; GRAVITT et al., 1998; SASAGAWA et al., 2000). Foram utilizados neste trabalho os *primers*

MY09/11 que amplificam um segmento do gene L1 (homologa entre os diferentes genótipos do HPV) tanto para o PCR convencional seguido do sequenciamento quanto o PCR em tempo Real com SYBR Green®. Para a identificação de genótipos específicos do HPV (16, 18 e 31) em PCR em tempo Real com Taqman® utilizou-se segmentos dos genes E6 e E7.

No primeiro momento as amplificações foram realizadas utilizando os *primer* MY09/11 (MANOS, 1989) obtendo 65 amostras positivas (21%). Destas, em 68% foi possível identificar o genótipo do HPV (44 amostras). Estes dados demonstram serem bem próximos a trabalhos já publicados com estes tipos de *primers*, como o publicado por Nonnenmacher e Breitenbach em 2002 com 975 mulheres, obtendo 16% (156 amostras) positivas para o HPV, como exemplificado na tabela 11 onde mostra os resultados obtidos por uma revisão na literatura mostrando os trabalhos publicados com os *primer* MY09/11 e os seus índices de acerto.

Devemos salientar que alguns fatores podem influenciar estes resultados, tanto para mais como para menos, as amostras utilizadas neste trabalho, a coleta do material biológico, o protocolo de extração do DNA e a padronização das reações. Em média o índice de positividade utilizando os *primers* universais MY09/11 foi de 26%, muito próximo ao obtido neste trabalho.

Um dado interessante obtido neste trabalho foi que as infecções múltiplas por mais de um genótipo do HPV (16 amostras - 24%), ocorre especialmente entre mulheres jovens que apresentam uma vida sexual mais ativa e ao longo de sua vida se relacionam com inúmeros parceiros. A frequência de múltiplas infecções obtida neste trabalho apresenta resultado também próximo ao descrito na literatura: Sahiner et al. (2014) com 23,3%; Corrêa et al. (2008) com 33%; Tozetti et al. (2006) com 26,8%; Huang et al. (2004) com 28,9%.

Tabela 11_ Trabalhos publicados envolvendo a detecção do HPV através da metodologia de PCR utilizando os *primers* MY09/11.

Referência	Amostragem	Amostras positivas	Índice de acerto	Índice total
(COPE et al., 1997)	596	189	32%	26,3%
(NONNENMACHER; BREITENBACH, 2002)	975	156	16%	
(SHERMAN et al., 2003)	20810	2979	15%	
(TSAI et al., 2005)	266	107	40%	
(ŞAHINER et al., 2014)	654	223	34,1	
Rocha, 2016	316	65	21%	

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

A prevalência de múltiplas infecções por HPV pode variar desde a escolha da população estudada e também na sensibilidade do método utilizado para a genotipagem (DAVIE, KORNEGAY, IFTNER, 2001). Em alguns trabalhos publicados com mulheres infectadas com HIV a ocorrência de múltiplos genótipos de HPV é maior, sendo encontrado 45%, 50% e 52%(LEVI et al., 2004; CAMPOS et al., 2005; LUQUE et al., 2006).

O alto índice de múltiplas infecções é um caso comum em mulheres portadoras de HIV, um motivo para isso pode ser a maior exposição a relações sexuais desprotegidas e a falhas no sistema imunológico, permitindo a replicação de mais de um tipo de HPV (PALEFSKY et al., 1999). Dados também mostram que há risco do aumento de lesões no colo do útero com a presença de múltiplos genótipos (TROTIER, FRANCO, 2006).

Dentre as amostras positivas que foram possíveis identificar com sequenciamento Sanger, os genótipos mais frequentes foram os de alto risco, HPV16(39%), HPV58(20%), HPV33(14%), HPV53(8%) HPV18(8%) e HPV31(8%). Estes genótipos correspondem aproximadamente a 84% dos casos de câncer na população brasileira (CROSBIE et al., 2013).

No Brasil o HPV16 é o genótipo mais predominante, seguido pelo HPV18, HPV31 e HPV33. Dependendo da região estudada no país outros tipos são mais frequentes, no Nordeste por exemplo o HPV58 é o terceiro mais frequente, seguido do HPV45, HPV31 e HPV33. Neste trabalho foi possível identificar os principais

genótipos com relevância na causa de câncer de colo do útero no Brasil (ELUF-NETO et al., 1994).

Em estudos recentes tem se demonstrando a eficiência na utilização da PCR em Tempo Real, em comparação da PCR convencional na identificação do vírus do HPV (DAPONTE et al., 2008). Em nosso estudo obtivemos a identificação de duas novas amostras não identificadas utilizando o PCR convencional, como mostrado na tabela 12.

Tabela 12_ Comparação dos números de amostras positivas e negativas utilizando o PCR convencional e a PCR em tempo real.

	PCR convencional	PCR em tempo Real
Negativas	22	20
Positivas	8	10

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

Em trabalho publicado por Cunha et al.(2007) foram comparadas as duas técnicas. Mostrou-se um aumento dos casos positivos em 40%, nossos resultados não chegaram a este valor, mas possivelmente analisando o restante das amostras encontraremos mais amostras positivas, devido ao uso da PCR em tempo real ser mais sensível.

A utilização das PCR em tempo real, além permitir uma rápida identificação do vírus, sem a necessidade de realizar eletroforese em gel, diminuição do risco de contaminação e aumento da sensibilidade do teste, também é possível saber a carga viral do HPV servindo como marca do pós tratamento do câncer do colo do útero (CARMO, FIORINI, 2007).

A adoção desta tecnologia em rotina de laboratórios apresenta algumas desvantagens, com o custo em infraestrutura e na aquisição do equipamento, treinamento dos técnicos e a compreensão pelos clínicos da utilização desta nova metodologia (CUNHA et al., 2007).

O grande avanço que proporcionou um enorme ganho para o presente estudo foi a utilização da tecnologia de sequenciamento de nova geração, ela é uma técnica relativamente nova e os primeiros sequenciadores começaram a ser produzidos em meados de 2005. Estas plataformas de alto rendimento e obtenção de dados podem sequenciar uma mistura heterogênea de material genético com

alta sensibilidade, ademais estes equipamentos trabalham para formar sequências independentes, tornando-as uma ferramenta importante para a descoberta de um vírus (DATTA et al., 2015).

Muitos pesquisadores acreditaram que boa parte dos vírus patogênicos humanos já haviam sido descobertas, mas o surgimento de novos vírus em nossa história recente como o Ebola, Hantavírus, SARS, vírus da gripe H1N1, H7N9 e vírus MERS já tem preocupado a todos (BICHAUD et al., 2014). Segundo estimativas recentes, há pelo menos 320 mil novos vírus em mamíferos a serem descobertos e segundo a organização mundial da Saúde (OMS), em advertência, “seria extremamente ingênuo e complacente pensar que não haverá nenhuma outra doença como Aids, outro Ebola, ou outro SARS mais cedo ou mais tarde” (ANTHONY et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Então, com a utilização de sequenciadores de nova geração na identificação de vírus que traz alta sensibilidade, fluxo de trabalho rápido e em vez de obter apenas uma região, como do HPV L1-MY09/11, poderíamos obter sequências do genoma completo do vírus.

Em uma busca na literatura, não obtivemos publicações do uso do NGS na rotina clínica para identificação do genoma completo do HPV e sim apenas do uso para sequenciar regiões do MY09/11 como nos trabalhos de Barzon et al. (2011); Conway et al. (2012); Cullen et al. (2015); Yin et al. (2016). A vantagem da tecnologia proposta neste trabalho não é de apenas sequenciar o MY09/MY11 em amostras coletadas de raspado de colo do útero, mas sim a descoberta de todos os microrganismos presentes na flora vaginal de uma mulher (Metagenoma). Como por exemplo bactérias - Gonorreia, Sífilis, Cancro Mole e Clamídia, vírus - HPV e Herpes Genital, protozoários – Tricomoníase e fungos - Candidíase (RAMOS, 2013). E mais, poderá ser útil também para a identificação de múltiplas infecções por HPV.

Como a disponibilização do equipamento NGS (MiSeq), para este projeto, foi iniciada apenas em 2016, poucas amostras foram analisadas (4 amostras). Desta forma, apesar do sucesso na metodologia ter sido demonstrado pela correta identificação dos vírus HPV, corroborando com os resultados do sequenciamento Sanger e SYBRGREEN, são necessários mais experimentos para estabelecer o NGS como rotina clínica.

As técnicas de biologia molecular utilizadas neste trabalho foram úteis para identificar o vírus do HPV antes que ocorra algum sintoma clínico, tem a capacidade de classificar os genótipos indicando quais são de alto ou baixo risco oncogênico. Elas são mais sensíveis e específicas que os testes citológicos, diminuindo os casos de falso-positivo e falso-negativo.

Portanto, tais métodos podem ajudar em muito a saúde pública, servindo como rastreio de diagnóstico precoce, evitando assim a evolução para o câncer cervical. Na tabela 14 é apresentado um resumo das técnicas utilizadas neste trabalho com suas vantagens e desvantagens.

Tabela 13_ Resumo das metodologias moleculares utilizadas neste trabalho com suas vantagens e desvantagens.

<i>Técnicas</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
PCR seguido por sequenciamento Sanger	-Custo médio -Utilizado em métodos de rastreio	- Sensibilidade reduzida - Necessita de um sequenciador automático de DNA
PCR em Tempo Real – SYBR Green®	-Sensibilidade média -Baixo custo nos reagentes -As reações são rápidas proporcionando o resultado final em menos 24 horas -Pode ser útil em programa de rastreio – Screening	-Custo moderado devido a aquisição do equipamento -Não permite realizar reações multiplex -Treinamento de pessoal especializado
PCR em Tempo Real – Taqman®	-Sensibilidade média -Possibilidade de realizar reações multiplex -As reações são rápidas proporcionando o resultado final em menos de 24 horas	-Custo alto devido a aquisição do equipamento mais os reagentes necessários -Treinamento de pessoal especializado
Sequenciamento de nova geração	-Sensibilidade alta -Proporciona identificar inúmeros microrganismos encontrados na amostra e qualifica-los -Pode ser muito útil na utilização de programa de rastreio, pois consegue identificar inúmeros microrganismos	-Custo elevado para aquisição do equipamento e reagentes -Treinamento de pessoal especializado -Tempo médio para realização do teste -Necessita uma grande quantidade de amostra para realizar uma corrida

Fonte: Dados de pesquisa do autor.

6. CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho obtivemos os seguintes resultados:

- Foi possível a identificação do vírus do HPV em quatro metodologias de biologia molecular utilizadas neste trabalho;
- O protocolo de extração de Powell e Gannon (2002) se mostrou vantajoso e demonstrou grandes resultados em relação ao kit comercial;
- Foram realizadas as amplificações das 316 amostras utilizando a técnica de PCR convencional seguida por sequenciamento e se mostrou útil na identificação dos genótipos obtendo 65 amostras positivas para o HPV;
- A técnica de PCR em tempo Real se mostrou vantajosa devido ao fato de sua sensibilidade ser mais alta e indicou ser útil, confiável e rápida para o diagnóstico do HP, podendo ser utilizada em teste de triagem substituindo os exames citológicos;
- A metodologia de sequenciamento de nova geração se mostrou muito interessante, sendo um dos primeiros trabalhos a serem publicados para o sequenciamento do DNA do HPV para uso em rotina. Ela apresentou uma sensibilidade maior que outras técnicas e foi possível realizar a quantificação.
- As técnicas de PCR em tempo Real com *SYBRGreen* e de sequenciamento de nova geração se mostraram úteis para serem utilizadas na prática clínica e em métodos de rastreio citológico. Mas a técnica de sequenciamento de nova geração se mostrou vantajosa devido ao fato que ele pode identificar outros microrganismos presentes na amostra, não apenas o HPV como ocorre nas outras.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 5 out. 1990.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 195–203, 2009.

ANTHONY, S. J. et al. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. **mBio**, v. 4, n. 5, p. e00598–13, 2013.

ASATO, T. et al. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 10, p. 1829–32, 2004.
BÄFVERSTEDT, B. Condylomata acuminata--past and present. **Acta dermato-venereologica**, v. 47, n. 5, p. 376–81, 1967.

BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Tipagem e Estado Físico de Papilomavírus Humano por Hibridização in situ em Lesões Intra-epiteliais do Colo Uterino Human Papillomavirus Typing and Physical State by in situ Hybridization in Uterine Cervix Intraepithelial Lesions. **Trabalhos Originais**, v. 26, n. 261, p. 59–64, 2004.

BAKER, T. S. et al. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. **Biophysical journal**, v. 60, n. 6, p. 1445–56, 1991.

BARCELOS, A. C. M. et al. Atypical squamous cells of undetermined significance: Bethesda classification and association with human papillomavirus. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2011, p. 904674, 2011.

BARTLETT, J. M. S. et al. Protocols Edited by. **Methods in Molecular Biology**, v. 226, 2003.

BARZON, L. et al. Human papillomavirus genotyping by 454 next generation sequencing technology. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 52, n. 2, p. 93–7, out. 2011.

BENNETT, S. T. et al. Toward the 1,000 dollars human genome. **Pharmacogenomics**, v. 6, n. 4, p. 373–82, jun. 2005.

BERNARD, H. U. 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. **The Journal of infectious diseases**, v. 170, n. 5, p. 1077–85, nov. 1994.

BICHAUD, L. et al. Arthropods as a source of new RNA viruses. **Microbial pathogenesis**, v. 77, p. 136–41, dez. 2014.

BOBEK, V. et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799–4804, 2010.

BOOY, F. P. et al. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 281, n. 1, p. 95–106, 1998.

BRENTJENS, M. H. et al. Human papillomavirus: A review. **Dermatologic Clinics**, v. 20, n. 2, p. 315–331, 2002.

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

BURD, E. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2003.

BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232–243, 2013.

BURNS, D. “Warts and all” -the history and folklore of warts: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 85, n. January, p. 37–40, 1992.

CALDAS, I.; TEIXEIRA, S.; RAFAEL, R. The human papillomavirus as a predictive factor of cervical cancer: updating study on the preventive nursing action. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 4, n. 2, p. 831–839, 2010a.

CALDAS, I.; TEIXEIRA, S.; RAFAEL, R. The human papillomavirus as a predictive factor of cervical cancer: updating study on the preventive nursing action. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 4, n. 2, p. 831–839, 1 abr. 2010b.

CAMARA, G. N. N. D. L. et al. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149–158, 2008.

CAPOBIANCHI, M. R.; GIOMBINI, E.; ROZERA, G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 1, p. 15–22, 2013.

CAPRA, G. et al. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. **Virus Research**, v. 133, n. 2, p. 195–200, 2008.

CARMO, E. F. S. DO; FIORINI, A. Principais Técnicas Moleculares Para Detecção Do Papilomavírus Humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29–31, 2007.

CASTLE, P. E. et al. Interlaboratory reliability of hybrid capture 2. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 122, n. 2, p. 238–245, 2004.

CAVALCANTI, M. D. P.; MARIA, V.; LORENA, B. DE. Para O Diagnóstico Das Doenças Infecciosas. **REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL**, v. 37, n. 1, p. 1–14, 2008.

CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F. N. INFECÇÕES CAUSADAS PELOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS ATUALIZAÇÃO SOBRE ASPECTOS VIROLÓGICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO. **Microbiologia (Madrid)**, v. 18, n. 1, p. 73–79, 2006.

COGGIN, J.; ZUR HAUSEN, H. Workshop on Papillomaviruses and Cancer. **Cancer Research**, v. 39, n. February, p. 545–546, 1979.

CONWAY, C. et al. Next-Generation Sequencing for Simultaneous Determination of Human Papillomavirus Load, Subtype, and Associated Genomic Copy Number Changes in Tumors. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 2, p. 104–111, mar. 2012.

COPE, J. U. et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2262–5, set. 1997.

CORRÊA, C. M. et al. Coinfecção HIV-HPV: prevalência e multiplicidade de genótipos do HPV no colo uterino Co-infection of HIV-HPV: prevalence and multiplicity of HPV genotypes in the cervix uterine Resumo Abstract. p. 2–7, 2008.

COSER, J. et al. Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 467–472, 2011.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, set. 2013.

CULLEN, M. et al. Deep sequencing of HPV16 genomes: A new high-throughput tool for exploring the carcinogenicity and natural history of HPV16 infection. **Papillomavirus Research**, v. 1, p. 3–11, dez. 2015.

CUNHA, D. M. C. et al. Detecção do genoma de HPV em pacientes com carcinoma espinocelular da laringe : Comparação entre os ensaios de PCR convencional e em tempo real. **Rbac**, v. 39, n. 4, p. 255–257, 2007.

D'ABRAMO, C. M. Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. **The Open Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 80–95, 4 jul. 2011.
DAPONTE, A. et al. Use of real-time PCR to detect human papillomavirus-16 viral loads in vaginal and urine self-sampled specimens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 6, p. 619–621, 2008.

DATTA, S. et al. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. **World journal of virology**, v. 4, n. 3, p. 265–76, 2015.

DAVIES, P.; KORNEGAY, J.; IFTNER, T. Current methods of testing for human papillomavirus. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 15, n. 5, p. 677–700, out. 2001.

DE RODA HUSMAN, A. M. et al. HPV prevalence in cytomorphologically normal cervical scrapes of pregnant women as determined by PCR: the age-related pattern. **Journal of medical virology**, v. 46, n. 2, p. 97–102, jun. 1995.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DEGENHARDT, Y. Y.; SILVERSTEIN, S. J. Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. **Journal of virology**, v. 75, n. 1, p. 151–60, 2001.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, maio 2006.

DUNN, S. T. et al. DNA extraction: An understudied and important aspect of HPV genotyping using PCR-based methods. **Journal of Virological Methods**, v. 143, n. 1, p. 45–54, 2007.

E.JUNIOR. **Aspectos Clínicos, Epidemiológicos E Moleculares Da Infecção Genital Pelo Papilomavírus Humano (Hpv) Em Adolescentes Da Região Metropolitana De Belém**. [s.l: s.n.].

ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British journal of cancer**, v. 69, n. 1, p. 114–9, 1994.

ENFERMAGEM, C. D. E. Câncer do colo uterino originado pelo papilomavírus humano(HPV): prevenção, evolução e tratamento. **Núcleo Interdisciplinar De Pesquisa,Icesp,Faculdades Promove De Brasília**, 2011.

EVANDER, M. et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **Journal of virology**, v. 71, n. 3, p. 2449–56, 1997.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento. **Projeto Diretrizes**, p. 1–19, 2002.

FLORES, E. R. et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. **Journal of virology**, v. 74, n. 14, p. 6622–31, 2000.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association**, v. 164, n. 7, p. 1017–1025, 2001.

FRAZER, I. H. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: A well evolved relationship. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 410–414, 2009.

FUJINAGA, Y. et al. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. **The Journal of general virology**, v. 72 (Pt 5), n. September 1984, p. 1039–44, maio 1991.

GARFIELD, E. All Sorts of Warts - Separating Fact from Fiction. **Science Literacy**, v. 11, n. 9, p. 3–11, 1988.

GHARIZADEH, B. et al. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, v. 7, n. 2, p. 198–205, 2005.

GRAVITT, P. E. et al. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 3020–3027, 1998.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–61, jan. 2000.

GREGOIRE, L. et al. Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2660–2665, 1989.

GUSTAFSSON, L. et al. International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. **International Journal of Cancer**, v. 71, n. 2, p. 159–165, 1997.

GUSTAFSSON, L.; ADAMI, H. O. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. **British journal of cancer**, v. 60, n. 1, p. 132–141, 1989.

HAMID, N. A.; BROWN, C.; GASTON, K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 10, p. 1700–1717, 2 maio 2009.

HOEFNAGEL, J. **Animalia Quadrupedia et Reptilia (Terra): Plate XLVII**. Disponível em: <<http://www.nga.gov/content/ngaweb/Collection/art-object-page.69793.html>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

HORVATH, C. A J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. **Virology journal**, v. 7, p. 11, 2010.

HOU, S. Y.; WU, S.-Y.; CHIANG, C.-M. Transcriptional Activity among High and Low Risk Human Papillomavirus E2 Proteins Correlates with E2 DNA Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45619–45629, 2002.

HUANG, L.-W. et al. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 29, n. 4, p. 271–6, abr. 2004.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 127, n. 8, p. 940–945, 2003.

HUBERT, W. G.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. **Journal of virology**, v. 76, n. 5, p. 2263–73, 2002.

IFTNER, T.; VILLA, L. L. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs.**, n. 31, p. 80–88, 2003.

ILLUMINA. **History of Illumina Sequencing**. Disponível em: <<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/solexa-technology.html>>. Acesso em: 1 mar. 2016a.

ILLUMINA. **Sequencing by Synthesis (SBS) Technology**. Disponível em: <<http://www.illumina.com/technology/next-generation>>. Acesso em: 1 mar. 2016b.
INCA. **Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas recomendações para profissionais de saúde**. [s.l.: s.n.]. v. 28

INCA. Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais. p. 25, 2012.
INCA. **Controle do Câncer do Colo do Útero**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce>. Acesso em: 3 jan. 2016a.

INCA. **Controle do Câncer do Colo do Útero**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio/deteccao_precoce>.

JANITZ, M. **Next-Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine**. [s.l.: s.n.]. v. 2008

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics: 2011. **CA Cancer J Clin**, v. 49, n. 2, p. 1,33–64, 1999.

KITCHENER, H. C.; CASTLE, P. E.; COX, J. T. Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 63–70, 2006.

KLETER, B. et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2508–2517, 1999.

LEE, S. H. et al. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. **Infectious agents and cancer**, v. 2, n. 1, p. 11, 2007.

LIMA, D. N. DE O. **Atlas de Citopatologia Ginecológica Brasília: Ministério da saúde**. [s.l.] Ministério da Saúde, 2012.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 2, p. 362–372, 2004.

LOOK FOR DIAGNOSIS. **Hybrid Capture Technique**. Disponível em: <https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=dna+probes%2C+hpv&lang=1>. Acesso em: 3 jan. 2016.

LUQUE, A. E. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-infected women in Rochester, New York. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 4, p. 428–434, 2006.

MANOS, M. M. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Mol Diagn Human Cancer Cells**, v. 7, p. 209–214, 1989.

MANZIONE, C. R.; NADAL, S. R.; CALORE, E. E. Oncogenicidade Do Papilomavírus Humano E O Grau De Neoplasia Intra-Epitelial Anal Em Doentes Hiv Positivo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 3, p. 282–285, 2004.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 3, p. 133–141, 2008.

MCCRORY, D. C. et al. Evaluation of cervical cytology. **Evidence report/technology assessment (Summary)**, n. 5, p. 1–6, jan. 1999.

MIRANDA, G. H. B. **Método para Processamento e Análise Computacional de Imagens Histopatológicas Visando Apoiar o Diagnóstico de Câncer de Colo do Útero Método para Processamento e Análise Computacional de Imagens Histopatológicas Visando Apoiar o Diagnóstico de Câncer de C.** [s.l: s.n.].

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. SUPPL., p. 43–51, 2005.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. **Parassitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 163–7, jun. 2004.

MOYA, A S. et al. Original Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano. **Rev Esp Quimioterap**, v. 19, n. N° 2, p. 161–166, 2006. MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. SUPPL. 3, p. 1–10, 2006.

MURAL ANIMAL. **Coelho com chifres, não é mito é vírus**. Disponível em: <<http://muralanimal.blogspot.com.br/2013/07/coelho-com-chifres-nao-e-mito-e-virus.html>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

NAMKOONG, S. E. Clinical application of HPV typing in cervical cancer. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 49, n. SUPPL., 1995.

NANDA, K. et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Annals of internal medicine**, v. 132, n. 10, p. 810–9, 16 maio 2000.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. ... **Paulo. Vol. 36, n. 1 (fev ...**, v. 36, n. 1, p. 95–100, 2002.

ORTH, G. et al. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 3, p. 1537–1541, 1978.

PALEFSKY, J. M. et al. Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection in. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 3, 1999.

PINHO, A. DE A.; MATTOS, M. C. F. I. DE. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 225–231, 2002.

POWELL, R.; GANNON, F. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. **Oxford Practical Approach Series**, p. 1–2, 2002.

PRACHAYANGPRECHA, S. et al. Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3722–3730, 2014.

QGENE. **Kit de coleta citológico**. Disponível em: <<http://www.qgene.com.br/>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

RAMA, C. H. et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Revista de Saude Publica**, v. 42, n. 3, p. 411–419, 2008.

RAMOS, S. DOS P. **As principais doenças sexualmente transmissíveis**. Disponível em: <<http://www.gineco.com.br/saude-feminina/doencas-femininas/dsts/>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

RAPAPORT, D. **HPV Livro: 2. Biologia do HPV**. Disponível em: <<http://hpvinfo.com.br/hpv-livro-2-biologia-do-hpv/>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

RESEARCH, G. V. **Next Generation Sequencing (NGS) Market Analysis By Application**. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

ROCHE. Detection Formats SYBR Green I/LightCycler 480 ResoLight Dye. **LightCycler Real-Time PCR Systems-Application Manual**, p. 18/140, 2015a.
ROCHE. **Cobas® HPV Test**. Disponível em: <www.hpv16and18.com>. Acesso em: 16 fev. 2016b.

RODRIGUES, A. D. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **J. Bras. Patol. Med.Lab.**, v. 45, n. 6, p. 457–462, 2009.

ROUS, P.; BEARD, J. W. The Progression To Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). **The Journal of experimental medicine**, v. 62, n. 4, p. 523–48, 1935.

SAEED, M. et al. Epidemiology and clinical findings associated with enteroviral acute flaccid paralysis in Pakistan. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 6, 2007.

ŞAHINER, F. et al. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 1, p. 43–9, set. 2014.

SASAGAWA, T. et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). **Virus Research**, v. 67, n. 2, p. 127–139, 2000.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727–46, 2005.

SCHMITZ, M. et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 4, p. 302–307, 2009.

SHERMAN, M. E. et al. Determinants of Human Papillomavirus Load among Women with Histological Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 : Dominant Impact of Surrounding Low-Grade Lesions 1. v. 12, n. October, p. 1038–1044, 2003.

SHOPE, R. E.; HURST, E. W. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. **The Journal of experimental medicine**, v. 58, n. 5, p. 607–24, 1933.

SILVA, A. M. T. C. et al. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em paciente com papilomatose laríngea recorrente. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 167–174, 2003.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. **International journal of cancer**, v. 121, n. 3, p. 621–32, 1 ago. 2007.

SNIJDERS, P. J. F. et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of broad spectrum papillomavirus genotypes. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 1, p. 173–181, 1990.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. **American Medical Association**, v. 287, n. 16, p. 2114–2119, 2002.

SOUTO, R., BORGIO, J. O Papilomavírus Humano : um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155–160, 2005.

SPEICH, N. et al. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: Genotype spectrum of patients from the west German area. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 125–128, 2004.

STILLMAN, M. J.; DAY, S. P.; SCHUTZBANK, T. E. A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader?? HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. S73–S77, 2009.

STUBENRAUCH, F. et al. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. **Journal of virology**, v. 74, n. 3, p. 1178–1186, 2000.

SYRJÄNEN, K. et al. Comparing PAP smear cytology, aided visual inspection, screening colposcopy, cervicography and HPV testing as optional screening tools in Latin America. Study design and baseline data of the LAMS study. **Anticancer Research**, v. 25, n. 5, p. 3469–3480, 2005.

TOZETTI, I. A. et al. Multiple Types of Human Papillomavirus in Cervical Samples in Women in Campo Grande , MS , Brazil. v. 10, p. 309–310, 2006.

TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. **The American journal of managed care**, v. 12, n. 17 Suppl, p. S462–72, dez. 2006.

TSAI, H.-T. et al. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 2544–9, nov. 2005.

UPPNEX. **Illumina Sequencing Sequencing by Synthesis**. Disponível em: <<https://www.uppmax.uu.se/illumina-sequencing>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; MAHY, B. W. J. Emerging Issues in Virus Taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 8–13, jan. 2004.

VERTERAMO, R. et al. Direct sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 9-10, p. 2517–2521, 2006.

VETTER, E. A et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 165–256, 2006.

VILLA, L. L.; DENNY, L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. S71–S80, 2006.

VIRALZONE. **Papillomaviridae**. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/5.html>.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WHITE, D. O. Medical Virology. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 19, n. 8, p. 592–592, 24 jan. 2007.

WOLD, B.; MYERS, R. M. Sequence census methods for functional genomics. **Nature methods**, v. 5, n. 1, p. 19–21, jan. 2008.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, jan. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health report -Global collaboration to meet threats to public health security**. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2007/overview/en/index2.html>>.

WRIGHT, T. C. CHAPTER 3 Pathology of HPV infection at the cytologic and histologic levels: Basis for a 2-tiered morphologic classification system. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 22–31, 2006.

YAMAGUCHI, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluorometry for screening of cervical cancer. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 318, n. 1-2, p. 41–9, 2002.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 337–348, 2004.

YIN, L. et al. HPV Population Profiling in Healthy Men by Next-Generation Deep Sequencing Coupled with HPV-QUEST. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 28, 25 jan. 2016.
ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 186, p. 131–56, 1994.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers.
Biochimica et biophysica acta, v. 1288, n. 2, p. F55–78, 9 out. 1996.

APÊNDICE

Soluções utilizadas no trabalho:

Essas soluções foram preparadas com água deionizada esterilizada e, quando necessário, foram esterilizadas por autoclavagem (à 121°C por 20 minutos) conforme descrito em Sambrook et al., 1982.

Solução Tampão Tris-HCl 1M pH 8,0.

Tris-base (USB®).....	12,11g
Água deionizada.....	100mL

Tris-base foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH desejado foi ajustado com solução de HCl e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

Solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5M pH 8.0.

EDTA (Merck®).....	18,61g
Água deionizada.....	100mL

O EDTA foi dissolvido em 80mL de água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH e o volume completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

Solução Tampão TE pH 8,0. (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA).

1M Tris-HCL pH 8,0	1mL
0,5M EDTA pH 8,0.....	0,2mL
Água deionizada.....	100mL

A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (10m/v).

SDS (Sigma®).....10g
 Água deionizada q.s.p.100mL

O SDS foi dissolvido em 50 mL de água deionizada aquecida a 60°C , sob agitação e o volume completado para 100mL. A solução foi estocada à temperatura ambiente.

Solução de Etanol a 70% (100mL).

Etanol P.A. (Merck®).....70mL
 Água deionizada.....30mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a 4°C.

Solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 10N.

NaOH (Merck®).....4g
 Água deionizada q.s.p.1000mL

As pastilhas de NaOH foram dissolvidas em 800mL de água e o volume completado para 1000mL. A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos e estocada a temperatura ambiente.

Solução de Acetato de Amônio 7,5 mol/L.

Acetato de Amônio (JT Baker®).....57,81g
 Água deionizada q.s.p.100mL

O Acetato de amônio foi dissolvido em 70mL de água deionizada e após dissolução o volume foi completado para 100mL com água deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem e estocada a temperatura ambiente.

Diluição da enzima Proteinase K 20mg/mL.

Proteinase K (Invitrogen [®])	20mg/mL
Água deionizada.....	1000mL

A enzima foi diluída em água deionizada e estocada a 4°C.

Solução de Loading Buffer 6X.

Azul de Bromofenol (USB [®])	25mg
Xileno Cianol (USB [®])	25mg
Glicerol (Merck [®]).....	3mL
Água deionizada q.s.p.....	10mL

O azul de bromofenol , xileno cianol e o glicerol foram diluídos em água deionizada e o volume foi completado para 10mL. A solução foi estocada a 4°C.

Solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 5mol/L.

NaCl (JT Baker [®])	146,1g
Água deionizada q.s.p.....	500mL

O NaCl foi dissolvido em 350mL de água e o volume foi completado para 500mL. A solução foi autoclavada a 121°C por 20 minutos e foi estocada a temperatura ambiente.

Solução de tampão de corrida TAE 50X.

Tris-Base (USB®).....	242g
Ácido Acético Glacial (JT Baker®).....	57,1mL
EDTA (Merck®).....	18,6 g
Água deionizada q.s.p.....	1000mL

Foi adicionado o Tris-Base, Ácido Acético Glacial e EDTA em 900mL de água deionizada. Homogeneizou-se a mistura e o volume foi completado para 1000mL. A solução foi estocada a temperatura ambiente.

Solução de tampão de corrida TAE 1X.

TAE 50X	20mL
Água deionizada q.s.p.....	1000mL

A mistura foi homogeneizada e estocada a temperatura ambiente.

ANEXO



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
 Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
 Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 06 de agosto de 2010.

Parecer: **053/2010**

Titulo do Projeto: “Detecção de Papilomavírus humano em uma Penitenciária Feminina de São Paulo – Brasil”.

Pesquisador Responsável: Daniela Etlinger

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado na categoria **APROVADO**.

- *Considerou-se a anuência da Penitenciária Feminina de São Paulo em participar do projeto no sentido implícito na frase “conforme pré estabelecido no início da parceria entre a Unidade Prisional e o Instituto Adolfo Lutz”, descrita no documento assinado por Gizelda Morato Costa, cargo de Diretor Técnico III, da Penitenciária Feminina Doutora Marina Marigo Cardoso de Oliveira do Butantan de 23 de julho de 2010.*

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
 Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador
 2ª via - CEPIAL
 LMT/dvmp