



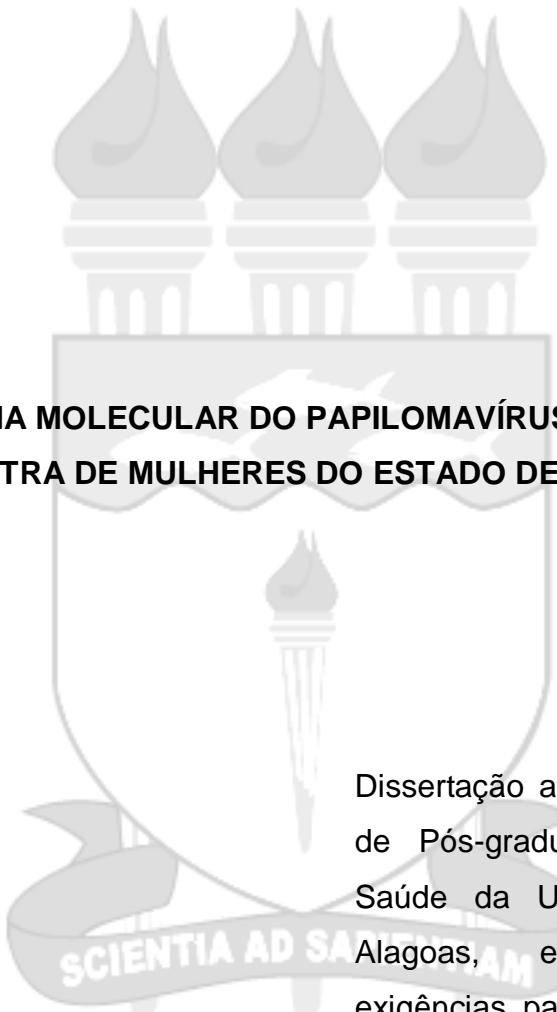
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MOEZIO DE VASCONCELLOS COSTA SANTOS FILHO**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM UMA  
AMOSTRA DE MULHERES DO ESTADO DE ALAGOAS**

Maceió  
2012

**MOEZIO DE VASCONCELLOS COSTA SANTOS FILHO**



**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM UMA  
AMOSTRA DE MULHERES DO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva.

Maceió  
2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

S237e Santos Filho, Moezio de Vasconcellos Costa.  
Epidemiologia molecular do papilomavírus humano em uma amostra de mulheres do estado de Alagoas / Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho. – 2012.  
74 f. : il., tab.

Orientador: Luiz Antônio Ferreira da Silva.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 64-69.  
Apêndices: f. 70-74.

1. Papilomavírus humano (HPV). 2. Gene L1. 3. Reação em cadeia da polimerase (PCR). 4. DNA - Sequenciamento. 5. GenBank. I. Título.

CDU: 616.97:578.2



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado  
CEP 57.010-020. Maceió-AL  
(82) 3223-5613; 3336-0757  
e-mail: [pgcs@propep.ufal.br](mailto:pgcs@propep.ufal.br)

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho, intitulado: "Epidemiologia molecular do papilomavírus humano em uma amostra de mulheres do Estado de Alagoas", orientado pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 16 de fevereiro de 2012.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato Aprovado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto – (UFPE)

Prof. Dr. Francisco Javier Tovar - (UFAL)

Prof. Dr. Dalmo Almeida de Azevedo – (ICBS/UFAL)

PRIMEIRO A DEUS, A MINHA FAMÍLIA E AOS MEUS AMIGOS, NOVOS E ANTIGOS,  
**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao amigo e Professor Luiz Antonio Ferreira da Silva, pela orientação, confiança, paciência e, principalmente, por mostrar o valor do amor pela ciência.

Ao amigo e Professor Dalmo Almeida de Azevedo por transmitir seus conhecimentos através de sua humildade e serenidade.

Ao amigo e Professor Francisco Javier Tovar por confiar em minhas habilidades, auxiliando no meu aprendizado.

À querida Professora Iede Ferreira da Silva pelas suas cobranças, seus conselhos e “puxões de orelha”.

Aos amigos do Laboratório de DNA Forense da Universidade Federal de Alagoas (Gustavo, Alex, Benísio, Daniel, Antônio, Djavan, Camila, Júnior, Yara, Elaine e Diogo), pela confiança e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, professores e funcionários.

Aos meus avós, por me ensinarem, demonstrando a pureza e o verdadeiro significado da família.

À família que eu escolhi na minha infância (Ana Marina, Artur, Belmiro, Edoarda, Francisco, Grazielle, Rafaele, Vívian e Will), por me mostrarem o valor do estudo e da dedicação para o alcance dos meus objetivos.

Agradeço, principalmente, aos meus pais, por passarem a maior herança que um filho poderia receber. A educação. Obrigado pelos sacrifícios, pelos conselhos e severidade em minha criação.

*“Verdades não o são por terem sido ditas por grandes mestres. Verdades são aquelas que, ditas por grandes mestres, tocam a nossa alma e nos inspiram a pô-las em prática.”*

*Lavínia Lins*

## RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae* e possui o seu genoma constituído de DNA. É o causador da transmissão sexual viral de maior frequência. O câncer cervical ou câncer de colo de útero possui a segunda maior ocorrência nas mulheres de todo o mundo. Estudos recentes têm comprovado que alguns tipos de HPV são os principais responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de câncer. De acordo com a sua atividade na carcinogênese esse grupo viral foi dividido em tipos de baixo e de alto risco oncogênico. O Brasil ainda não possui uma quantidade representativa de dados relacionados à prevalência de infecção por HPV, os dados de incidência do vírus são obtidos através da análise de portadores de carcinoma invasivo de colo uterino, neoplasias intraepiteliais cervicais e outros tipos de infecções associadas. Ensaio moleculares vêm mostrando ao longo dos anos uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV. Atualmente são utilizadas técnicas de hibridização como método de escolha para a detecção do DNA viral. Em muitos estudos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a aplicação dos *primers* MY09 e MY11 demonstrou eficiência no rastreamento viral, conseqüentemente, o desenvolvimento desse diagnóstico molecular possibilitaria o monitoramento da doença, diminuindo as taxas de mortalidade causada pelo câncer de colo do útero. O sequenciamento de DNA é uma metodologia eficiente para a caracterização molecular dos tipos virais, permitindo a realização do alinhamento por similaridade das sequências obtidas com outras já identificadas e depositadas no GenBank. O presente trabalho teve como propósito identificar os diferentes tipos de HPV e a presença de co-infecções, através de PCR e sequenciamento de uma região hipervariável do gene  $L_1$ . A amostra estudada foi composta de 515 voluntárias das quais 111 (21,55%) apresentaram a presença do DNA do HPV. Entre os espécimes encontrados 50% são considerados de alto risco oncogênico (maior incidência dos tipos 16 e 58) e 7,21% possuíam infecção múltipla. A determinação das sequências de base do gene  $L_1$  é fundamental para a identificação do tipo viral. Entretanto o sequenciamento do gene completo e em ambos os sentidos da cadeia de DNA se tornam inviáveis financeiramente para a maioria dos laboratórios especializados. Uma abordagem prática aplicada no estudo foi determinar a sequência de uma região específica do gene  $L_1$  contendo 450pb, sendo possível a identificação do HPV seguindo essa metodologia. As técnicas utilizadas mostraram a necessidade da aplicação de um diagnóstico viral mais sensível e específico, contribuindo para o controle da infecção viral e para a diminuição da incidência e da mortalidade causadas pelo câncer cervical.

Palavras-chave: 1. Papilomavírus Humano (HPV). 2. Gene  $L_1$ . 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 4. Sequenciamento de DNA. 5. GenBank.



## ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is a virus of the *Papillomaviridae* family and its genome consists of DNA. It is the main cause of viral sexual transmission. Cervical cancer or uterine colon cancer is the second most common occurrence among women worldwide. Recent studies have proven that some types of HPV are mainly responsible for the development of this type of cancer. In accordance to its oncogenic activity this viral group was divided in low and high risk types. Brazil does not have a representative amount of data related to the prevalence of HPV infection. The incidence data of the virus is obtained through the analysis of carriers of the invasive carcinoma of uterine colon, cervical intraepithelial neoplasias, and others types of infections associated. Molecular assays have been showing throughout the years an excellent sensitivity and specificity in the detection of the HPV's DNA. Nowadays, *in situ* hybridization techniques are being used as method of choice for the detection of the viral DNA. In many studies, the Polymerase Chain Reaction (PCR) with the application of the primers MY09 and MY11 have shown efficiency in viral tracking, consequently, the development of molecular diagnostics allow monitoring of the disease, decreasing mortality rates caused by cancer of the cervix. The DNA sequencing is an efficient methodology used for the molecular characterization of the viral types, which allows the accomplishment of the alignment for similarity of the sequences obtained through others that were already identified and deposited in the GenBank. The current study's purpose was to identify the different types of HPV and the presence of co-infections through PCR and sequencing of a hyper-variable region of the *L1* gene. The studied sample consisted of 515 female volunteers, which 111 (21.55%) presented the incidence of the HPV DNA. Within the acquired specimens, 50% were considered high oncogenic risk (the major incidence was types 16 and 58) and 7.21% had multiple infection. The determination of the base sequencing of the *L1* gene is essential to the identification of the viral type. However, the sequencing of the complete gene and both DNA chains become financially unviable for the majority of the specialized laboratories. A practical approach applied in this study was to determine the sequencing of a specific region of the *L1* gene with 450pb, where the identification of the HPV became possible by following this methodology. The techniques used showed the necessity of the application of a more sensible and specific viral diagnosis, which contributes to the viral infection control and to the reduction of the mortality rate caused by cervical cancer.

Key Words: 1. Human Papillomavirus (HPV). 2. *L1* gene. 3. Polymerase Chain Reaction (PCR). 4. DNA Sequencing. 5. GenBank.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Aspectos clínicos de condilomas. A) acometimento da região genital nos grandes e pequenos lábios na mulher. B) Região genital balanoprepucial com múltiplas lesões condilomatosas no homem.....	23
Figura 2 -	Indicações das regiões mais comuns para o aparecimento das lesões genitais no homem e na mulher. Característica clínica de uma lesão condilomatosa.....	24
Figura 3 -	Preparação citológica com a presença de <i>coilocitos</i> . Células apresentando zona perinuclear ampla e irregular. Núcleos aumentados e presença de binucleação.....	26
Figura 4 -	Esquema mostrando o genoma do HPV <sub>16</sub> com 7904pb e as respectivas regiões onde se localizam as ORFs ( <i>open reading frame</i> ) na sequência.....	29
Figura 5 -	Mapa político-administrativo do Estado de Alagoas sinalizando a localização das regiões de origem das pacientes voluntárias.....	39
Figura 6 -	Mapa das regiões administrativas da cidade de Maceió sinalizando os bairros de origem das pacientes voluntárias residentes na capital.....	40
Figura 7 -	Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os casos positivos são identificados pela presença do fragmento de DNA contendo 450 pb: (1) Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). (2) Vazio. (3) Controle positivo. (4, 5, 7, 8) Amostras positivas. (6 e 9) Amostras negativas. (10) Controle negativo.....	47
Figura 8 -	Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Contém amostras que foram refeitas devido à baixa intensidade das bandas no primeiro ensaio: (1 e 8) Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). (2 e 9) Controle positivo. (3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13) Amostras confirmadas como positivas. (7 e 14) Controle negativo.....	48
Figura 9 -	Proporções da distribuição dos casos positivos e negativos dentro da amostra estudada.....	49
Figura 10 -	Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% para a diluição e padronização das concentrações utilizadas no sequenciamento: (5) <i>Low DNA Mass Ladder</i> (Invitrogen, CA, USA). (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) DNA viral purificado.....	50

Figura 11 -	Eletoferogramas analisados pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a qualidade das cadeias nucleotídicas. A) Sequencia de boa qualidade. B) Sequencia de baixa qualidade.....	51
Figura 12 -	Eletoferograma analisado pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a análise do pico para a confirmação do nucleotídeo.....	51
Figura 13 -	Eletoferogramas analisados pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando o sentido do sequenciamento nas duas fitas da cadeia de DNA viral. A) Sequenciamento com os iniciadores MY09. B) Sequenciamento reverso com os iniciadores MY11.....	52
Figura 14 -	Eletoferograma analisado pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a presença de picos sobrepostos na cadeia de nucleotídeos sequenciada.....	53
Figura 15 -	Organização de uma sequencia realizada pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems). Procedimento realizado antes da identificação dos tipos de HPV.....	53
Figura 16 -	Alinhamento de uma sequencia obtida ( <i>Query</i> ) com uma região já conhecida do banco de genomas online ( <i>Sbjct</i> ) utilizando a ferramenta <i>BLAST</i> . As linhas vermelhas indicam o pareamento com o genoma do HPV 58 com um nível de similaridade de 99%, sendo destacadas também as regiões diferentes identificando assim o tipo viral da cadeia sequenciada.....	54
Figura 17 -	Gráfico de uma sequencia obtido pelo software pDRAW32 (AcaClone Software) indicando os sítios de restrição das enzimas utilizadas.....	55
Figura 18 -	Simulação de uma eletroforese em gel de agarose a 2% obtida pelo software pDRAW32 (AcaClone Software). Os dados <i>in silico</i> demonstram a aplicação do marcador de peso molecular de 100pb e o padrão dos fragmentos de DNA de um vírus utilizando as endonucleases Ddel, Hae III, PstI e RsaI.....	55
Figura 19 -	Gráfico em colunas demonstrando a distribuição dos genótipos encontrados na amostra analisada.....	57
Figura 20 -	Proporções dos genótipos de alto risco, baixo risco e de risco indeterminado rastreados entre os 20 tipos identificados.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição regional no Brasil de genótipos do HPV.....	21
Tabela 2 -	Equivalências entre as diferentes classificações do pré-câncer ginecológico.....	27
Tabela 3 -	Divisão do número de amostras coletadas e os respectivos locais de atendimento dos serviços de ginecologia.....	38
Tabela 4 -	MY09 e MY11. Conjuntos de <i>primers</i> consensos utilizados para a amplificação da região alvo presente no gene L <sub>1</sub> do Papilomavírus Humano.....	42
Tabela 5 -	Quantidades de DNA recomendadas para as reações de sequenciamento.....	44
Tabela 6 -	Distribuição dos tipos virais identificados.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ATA	Ácido Tricloroacético
BPV	Papilomavírus Bovino
cm	Centímetros
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ddATP	Didesoxiadenosina trifosfato
ddCTP	Didesoxicitidina trifosfato
ddGTP	Didesoxiguanosina trifosfato
ddNTP	Didesoxirribonucleosídeo trifosfatado
ddTTP	Didesoxitimidina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gravidade (Unidade de centrifugação)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Iα-6	Integrina α-6
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
mg/mL	Miligramas por mililitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minutos

mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanometro
P	Promotor
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
pmolar	Picomolar
<i>Query</i>	Sequencia de entrada para o alinhamento por similaridade <i>BLAST</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
s	Segundos
Sbjct	Sequencia identificada depositada no banco de genomas
TE	Tampão tris / EDTA
UV	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1 Epidemiologia do Papilomavírus Humano</b> .....	18
2.1.1 Panorama do HPV no Brasil e no mundo.....	18
2.1.2 Fatores de risco para infecção por HPV.....	19
2.1.3 Distribuição dos tipos de HPV.....	20
2.1.4 Aspectos clínicos.....	21
2.1.5 Aspectos subclínicos.....	25
2.1.6 Vacinas aplicadas ao HPV.....	28
<b>2.2 Biologia do HPV</b> .....	27
2.2.1 Estrutura molecular.....	28
2.2.2 Ciclo molecular da infecção.....	29
<b>2.3 Carcinogênese do HPV</b> .....	31
2.3.1 Alterações pré-cancerígenas.....	31
2.3.2 Genes e o câncer cervical.....	33
<b>2.4 Co-infecções com outros tipos de HPV</b> .....	34
<b>2.5 Rastreamento do DNA-HPV</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	37
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1 Descrição da Amostra</b> .....	38
4.1.1 Características gerais da amostra.....	38
4.1.2 Critérios de inclusão da amostra.....	39
4.1.3 Formação da amostra.....	39
<b>4.2 Rastreamento do DNA do Papilomavírus Humano</b> .....	41
4.2.1 Extração do DNA total da amostra.....	41
4.2.2 Reação de amplificação.....	41
4.2.3 Eletroforese em gel para a detecção de amostras positivas.....	42
<b>4.3 Sequenciamento do DNA</b> .....	43
4.3.1 Purificação dos produtos da reação de PCR.....	43
4.3.2 Quantificação do DNA.....	43
4.3.3 Reação de sequenciamento e purificação do produto.....	44
4.3.4 Eletroforese capilar.....	45
<b>4.4 Ensaios <i>in silico</i></b> .....	45
4.4.1 Alinhamento <i>BLAST</i> .....	45
4.4.2 Obtenção do padrão de restrição <i>in silico</i> .....	46
<b>5 RESULTADOS</b> .....	47
<b>5.1 Diagnóstico Positivo do Papilomavírus Humano</b> .....	47
<b>5.2 Ensaios de Sequenciamento do DNA</b> .....	49
<b>5.3 Tipagem Genética do Papilomavírus Humano por Similaridade</b> .....	53
<b>5.4 Distribuição dos Genótipos</b> .....	56

<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6.1 Rastreamento Molecular do Papilomavírus Humano.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2 Análise de Sequenciamento do Papilomavírus Humano.....</b>	<b>59</b>
<b>6.3 Ensaios <i>in silico</i> e Genotipagem do Papilomavírus Humano.....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>74</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, possui um capsídeo com forma icosaédrica e o genoma constituído de DNA. O HPV infecta células basais do epitélio estratificado causando lesões na pele e mucosas como verrugas comuns, verrugas genitais e condilomas, induzindo tumores epiteliais e fibroepiteliais. Tais lesões possuem características histológicas fundamentais. Essas alterações clínicas têm crescimento limitado e com frequência regridem espontaneamente (VERTERAMO et al., 2009).

O HPV possui a transmissão sexual viral mais frequente. A precocidade das atividades sexuais, a variabilidade de parceiros e a nuliparidade estão reconhecidamente associados a sua disseminação. Nos Estados Unidos, onde a incidência é extremamente alta, estima-se que a prevalência da manifestação clínica dessa infecção seja de aproximadamente 1% entre pessoas adultas sexualmente ativas e pelo menos 15% possui a infecção subclínica, detectada pelas técnicas moleculares que visam à análise do DNA viral (LEE et al., 2009).

O câncer cervical ou câncer de colo de útero possui a segunda maior ocorrência nas mulheres de todo o mundo e é o principal câncer na maioria dos países em desenvolvimento. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), foram registrados 270 casos de câncer cervical no Estado de Alagoas no ano de 2008.

Estudos recentes têm comprovado que alguns tipos de HPV são os principais responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de câncer. De acordo com a sua atividade na formação tumoral esse grupo viral foi dividido em tipos de baixo e de alto risco oncogênico (NOBRE et al., 2008).

O Brasil ainda não possui uma quantidade representativa de dados relacionados à prevalência de infecção por HPV, as informações sobre a incidência do vírus são obtidas através da análise de portadores de carcinoma invasivo de colo uterino, neoplasias intraepiteliais cervicais e associações com outros tipos de infecções (GONÇALVES et al., 2008). No Brasil, entre 1979 e 2000 ocorreu um aumento de 33,1% na mortalidade por câncer de colo uterino devido a não detecção precoce do vírus, ou seja, na fase pré-invasiva da doença (Organização Mundial da Saúde, 2008).

Técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em amostras citológicas negativas colhidas anteriormente ao desenvolvimento do câncer constatando-se a presença do DNA-HPV cerca de 6 anos antes do aparecimento da doença (Sociedade Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2002). A detecção de DNA-HPV mesmo em citologia negativa e incluindo a paciente em um grupo de maior risco e, conseqüentemente um segmento complexo visando a detecção precoce de lesões intra-epiteliais, contribuiria com a diminuição dos índices de mortalidade (WANDERLEI-SILVA et al., 2005; QUINT et al., 2006).

Ensaio molecular demonstrou ao longo dos anos uma alta sensibilidade e especificidade na detecção do DNA do HPV. Atualmente, são utilizadas técnicas de hibridização como método de escolha para a detecção viral em esfregaços e amostras de tecido. Através de diversas metodologias de hibridização, tais como, *Southern blot*, Hibridização *in situ* e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo esta última a mais sensível e específica. A PCR caracteriza-se pela amplificação de quantidades diminutas de sequências de DNA-alvo. Para que isso ocorra são necessários iniciadores (*primers*) que irão hibridizar com essas sequências, sendo os mais utilizados os iniciadores universais MY09 e MY11 que identificam todos os genótipos de HPV conhecidos (SILVA et al., 2004).

Existem mais de 150 tipos e subtipos de HPV já identificados, aproximadamente 40 tipos são mucosos, sendo divididos em baixo e alto risco oncogênico, podendo estar intimamente relacionados ao desenvolvimento de neoplasias e carcinomas (MUÑOS et al., 2003).

Estudos anteriores constataram que o sequenciamento de DNA é uma metodologia eficiente para a caracterização molecular dos tipos virais. O sequenciamento de bases permite a realização da comparação das sequências utilizando a ferramenta *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Utilizando esta metodologia é possível fazer a identificação dos diferentes tipos virais de HPV conhecidos (CORRÊA, 2005).

O presente trabalho tem como objetivo identificar os diferentes tipos de HPV, através de PCR e sequenciamento de parte do gene  $L_1$  em uma amostra de mulheres do estado de Alagoas. Os resultados poderão contribuir para a complementação de dados estatísticos relacionados às infecções e cânceres

causados pelo Papilomavírus Humano no Brasil e tornar o diagnóstico mais eficiente das infecções potencialmente resultantes em câncer cervical.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Epidemiologia do Papilomavírus Humano (HPV)

#### 2.1.1 Panorama do HPV no Brasil e no mundo

O Brasil não possui dados estatísticos da prevalência da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) na população sexualmente ativa. Os dados em relação ao HPV são obtidos através de pacientes que já desenvolveram alterações mais graves que são precursoras do câncer de colo do útero (câncer cervical). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2008) o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical é a infecção pelo HPV. No Brasil, entre 1979 e 2000 houve um aumento de 33,1% da mortalidade por câncer de colo uterino. Em 2003, 16.480 novos casos foram registrados, com 4.110 óbitos. Apesar das taxas de mortalidade por câncer no Brasil serem as mais altas do mundo, este número ainda continua aumentando (ROSENBLATT et al., 2005).

Na década de 1990 o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer (INCA), iniciaram um projeto pioneiro em cinco municípios (Curitiba, Brasília, Recife, Rio de Janeiro e Belém) e em todo o Estado de Sergipe, sendo chamado de “Viva Mulher”, esse programa tinha como finalidade a prevenção e controle do câncer de colo do útero. Nos anos seguintes o programa foi intensificado ficando sob a gestão do INCA. O Alvo é a população feminina sexualmente ativa na faixa etária de 25 a 59 anos. Os focos deste projeto são os procedimentos primários que incluem o teste ginecológico e a coleta para o exame de citologia. Existe uma grande deficiência no auxílio de pessoas diagnosticadas com câncer (Instituto nacional do Câncer, 2008).

A maioria das pacientes possui necessidade de tratamento das lesões pré-invasivas e invasivas, sendo o tratamento baseado em cirurgias, quimioterapia e radioterapia. Essa deficiência se torna visível ao observar o número de mortes causadas pelo câncer cervical em 2000 (3.953) e em 2003 (4.110) (PINOTTI; RICCI, 2005).

Foi realizado em 1995 uma metanálise com dados de 22 países, registrando a associação do HPV com 75 a 100% dos casos de câncer cervical, com média de 92,9%. Entretanto esse número se torna variável dependendo da técnica

de diagnóstico utilizada. Aplicando o ensaio de PCR foi encontrada uma associação do HPV com esse carcinoma em 99,7% das pacientes analisadas (WALBOOMERS et al., 1999).

### 2.1.2 Fatores de risco para a infecção por HPV

Segundo pesquisas realizadas em diferentes estados brasileiros, foram identificados alguns fatores de risco para a aquisição de infecção por HPV (ROSENBLATT et al., 2005):

- a) Idade: da mesma forma que acontece em outras DSTs, a incidência dessa infecção é mais elevada logo após os primeiros anos de atividade sexual, entre jovens de 18 a 28 anos de idade. Existe um declínio visível com a idade, isso pode ser devido aos aspectos epidemiológicos como a transitoriedade da lesão, desenvolvimento de imunidade viral e redução de exposição a novos parceiros. O mecanismo não está totalmente elucidado. Ainda não se sabe se a imunidade é expressa pela eliminação do vírus ou pela diminuição da carga viral a níveis não detectáveis por métodos de diagnóstico atuais.
- b) Tabagismo: existe uma diminuição significativa na quantidade e na função das células de Langerhans devido ao tabagismo. Essas células são apresentadoras de antígenos e são responsáveis pela imunidade celular local contra o HPV. A concentração de substâncias químicas que induzem mutação como a nicotina, fenóis e hidrocarbonetos, encontrados de forma concentrada no muco cervical de mulheres tabagistas, é uma das possíveis causas da carcinogênese.
- c) Imunossupressão: já é estabelecido que algumas pessoas possuem risco particularmente elevado para o desenvolvimento de uma infecção por HPV, bem como lesões induzidas pelo mesmo. Entre essas pessoas encontramos aquelas que apresentam epidermodisplasia verruciforme com risco aumentado para câncer de pele, transplantados e imunossuprimidos por outras razões, em particular pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

- d) Gravidez: Os mecanismos celulares da infecção por HPV em gestantes não são muito conhecidos, porém seus sintomas/lesões parecem ser mais evidentes. Este fato é devido ao aumento da replicação viral durante este período. Os casos positivos de HPV têm uma alta incidência na segunda metade da gestação. A presença dessa infecção na gravidez expõe ao risco da transmissão vertical (fetal) ao recém-nascido. A contaminação parece ocorrer durante o contato entre o feto e o trato genital materno.

### 2.1.3 Distribuição dos tipos de HPV

São conhecidos mais de 150 tipos e subtipos de HPV, entretanto cerca de 20% não são classificados. O HPV tipo 1 e 2 está intimamente ligado as verrugas plantares e palmares. Já os tipos 9, 12, 14, 15, 17, 19, 25, 36 e 40 são encontrados em epidermiodisplasias verruciformes. Cerca de 40 tipos distintos tem predileção pelo epitélio anogenital e são subdivididos em baixo e alto risco oncogênico ou de risco indeterminado. Essa divisão se baseia em sua atividade carcinogênica, existindo diferença quanto ao risco de desenvolvimento de câncer entre os vírus do ultimo grupo. Consideram-se os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 como sendo de baixo risco, enquanto os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 são considerados de alto risco. O grupo de risco indeterminado é composto pelos tipos 30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91 (NOBRE et al. 2008). O que vai determinar o perfil oncogênico do vírus é sua capacidade de inserir seu material genético no DNA da célula hospedeira. Apesar de quinze tipos serem considerados de alto risco, 95% dos cânceres de colo do útero estão associados aos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 (MUÑOZ et al., 2003).

A prevalência dos tipos de HPV associados ao câncer cervical também apresentam variações geográficas. Estudos extensos têm demonstrado a presença do HPV-16 como o mais incidente em 21 países estudados. Já o HPV-18 possui maior prevalência na Argélia e Indonésia. O maior número de tipos de alto risco se encontra na África e América Latina. No Brasil, o HPV-16 é o mais frequente, todavia, existe a prevalência de outros tipos virais (Tabela 1) (ROSENBLATT et al., 2005).

Tabela 1 - Distribuição regional no Brasil de genótipos do HPV.

HPV	Região Norte	Região Nordeste	Região Central	Região Sudeste	Região Sul
16	43,5%	59,3%	57,1%	53,8%	52,2%
33		5,1%	8,9%	1,6%	
18	8,2%	5,1%	5,4%	8,6%	8,7%
31		11,9%	1,8%	1,6%	4,3%
45					4,3%
Outros		8,5%			17,4%
Não tipados	6,8%		7,1%	18,8%	

Fonte: Rosenblatt et al., 2005.

#### 2.1.4 Aspectos clínicos

As verrugas genitais foram descritas há muito tempo. Escrituras da Grécia antiga já faziam menção a lesões papilomatosas e verrugosas, que acometiam não somente a área genital, mas as regiões palmar e plantar. Ficaram conhecidas como *Condyloma acuminatum*, *Thymus* ou *Thimion*. Rapidamente essas lesões condilomatosas foram associadas à transmissão venérea por serem encontradas em pessoas de comportamentos promíscuo, incestuoso e homossexual (ROSENBLATT et al., 2005).

No início da era romana a doença se disseminou rapidamente, fato ocorrido devido à provável liberdade sexual e comportamental da época. No final do século XV na Europa, o aumento da incidência da sífilis causou novamente o interesse pelas doenças genitais. Eram atribuídas a venenos venéreos. As lesões condilomatosas eram consideradas como uma manifestação da sífilis. Alguns estudiosos consideravam essas doenças como expressão da gonorréia, denominando-as de verrugas gonorréicas; outros, entretanto, acreditavam que a causa seria a irritação da epiderme por agentes encontrados na decomposição do esmegma ou de fluxos genitais (DÔRES et al., 1991).

Durante muitos anos a relação entre verrugas comuns da pele e verrugas genitais era confusa, principalmente quando se tratava de etiologia e transmissibilidade. Essa estreita semelhança entre ambas foi confirmada, inicialmente, por estudos clínicos e experimentais. Clinicamente os autores se baseavam no fato de muitos pacientes com verruga de pele também apresentarem lesões genitais. Corroborando com os resultados clínicos, experimentalmente, a

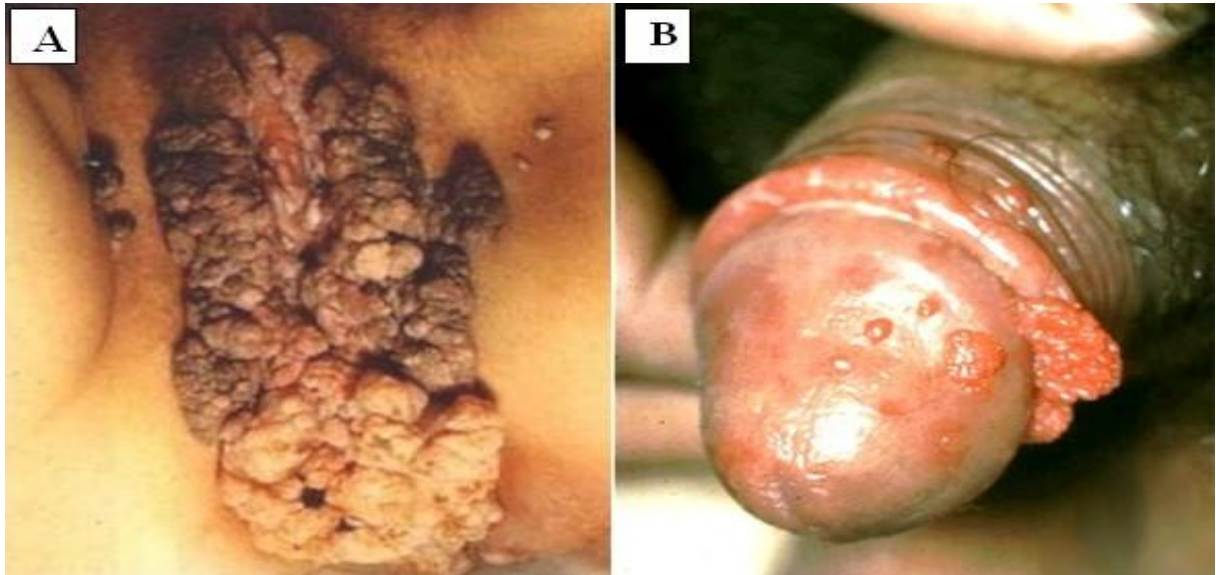
inoculação de extratos retirados de verrugas genitais em outras regiões de pacientes induzia o aparecimento de verrugas planas ou comuns (ORIEL; ALMEIDA, 1970).

A partir da terceira década do século XX, o ato sexual foi considerado como o principal meio de transmissão das verrugas genitais. Estudos foram realizados utilizando esposas de combatentes que voltaram da guerra do Japão e Coréia apresentando lesões verrugosas. O aparecimento da doença nessas mulheres acontecia de forma simultânea, com o período de incubação variando de quatro a seis semanas (BARRETT et al., 1954). Anos depois, estudos semelhantes observaram o contato sexual como transmissibilidade, pois mais da metade das pacientes analisadas que praticaram o ato com portadores dessas lesões apresentaram o problema após três meses. O resultado obtido foi de que as verrugas genitais, diferente das verrugas comuns, possuíam um caráter venéreo (TEOKHAROV, 1969).

As verrugas genitais ou condilomas acuminados são lesões pontiagudas que se caracterizam por serem aparentes, vascularizadas e com múltiplas projeções papilares. São conhecidas popularmente como “crista de galo” (Figura 1). A maioria dessas lesões se relaciona com tipos específicos do agente causador. As verrugas anogenitais são, na maioria das vezes, assintomáticas. Geralmente são acompanhadas por ardência, prurido e umidade. Elas aparecem frequentemente em formas múltiplas e coalescentes, podendo, ainda, apresentarem um aspecto queratinizado (AGAROSSO et al., 2002).



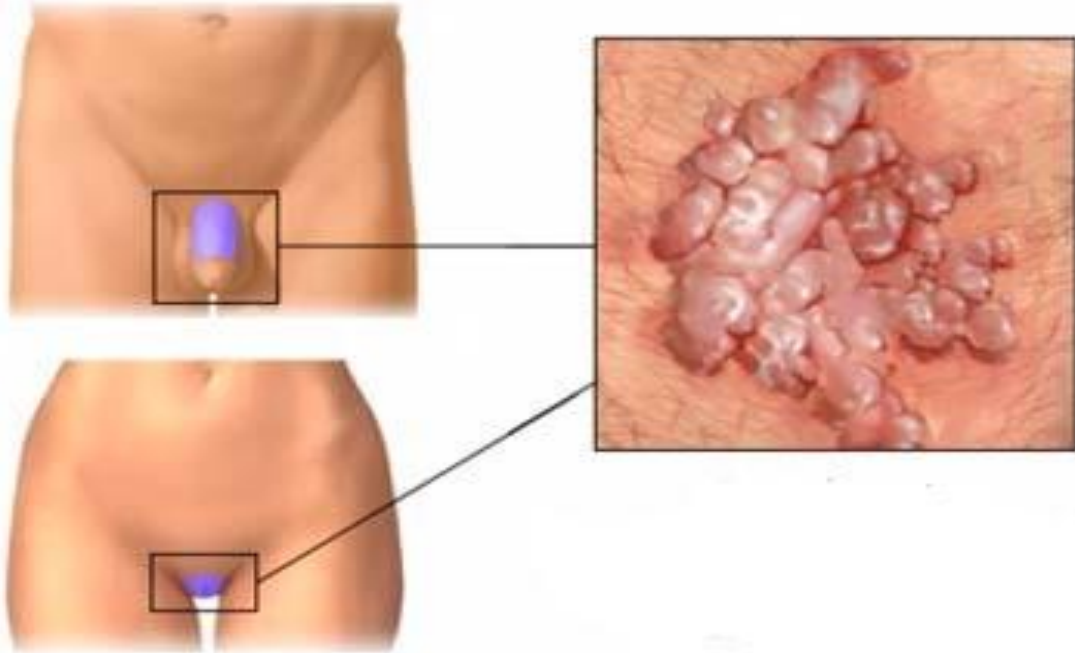
Figura 1 - Aspectos clínicos de condilomas. **A)** acometimento da região genital nos grandes e pequenos lábios na mulher. **B)** Região genital balanoprepucial com múltiplas lesões condilomatosas no homem.



Fonte: Dermis, disponível em: <<http://lookfordiagnosis.com>>. 2011.

A disseminação dessas lesões ocorre de forma rápida. Na mulher pode se estender ao clitóris e ao monte de Vênus, assim como para a região anal e perianal. No homem essas lesões se localizam, na maioria dos casos, na parte balanoprepucial (Figura 2). Essas regiões, tanto no homem quanto na mulher, são regiões de grande atrito durante o ato sexual, contribuindo para a instalação dessa enfermidade (DAVIDSON, 1977).

Figura 2 - Indicações das regiões mais comuns para o aparecimento das lesões genitais no homem e na mulher. Característica clínica de uma lesão condilomatosa.



Fonte: Soft, disponível em: <<http://softreceitas.blogspot.com/2011/01/hpv-e-os-papilomavirus-galdinosaqua.html>>. 2011.

Com o auxílio da microscopia eletrônica, foi dado um grande passo no rastreamento do agente etiológico. Foi detectada a presença de partículas virais no interior de células papilomatosas da pele (BUNTING, 1953). Em meados da década de 1960 foi identificado como agente o Papilomavírus Humano, onde atualmente é considerado o principal microorganismo responsável por essas anormalidades (DUNN; OGILVIE, 1968).

A transmissão do HPV ocorre pelo contato epitélio-epitélio, por isso se caracteriza como uma doença venérea. Existem outras vias de contágio como a contaminação congênita ou vertical. Algumas pesquisas sugerem uma transmissibilidade por fômites (objetos inanimados como toalhas e peças íntimas). (PASSOS, 1995).

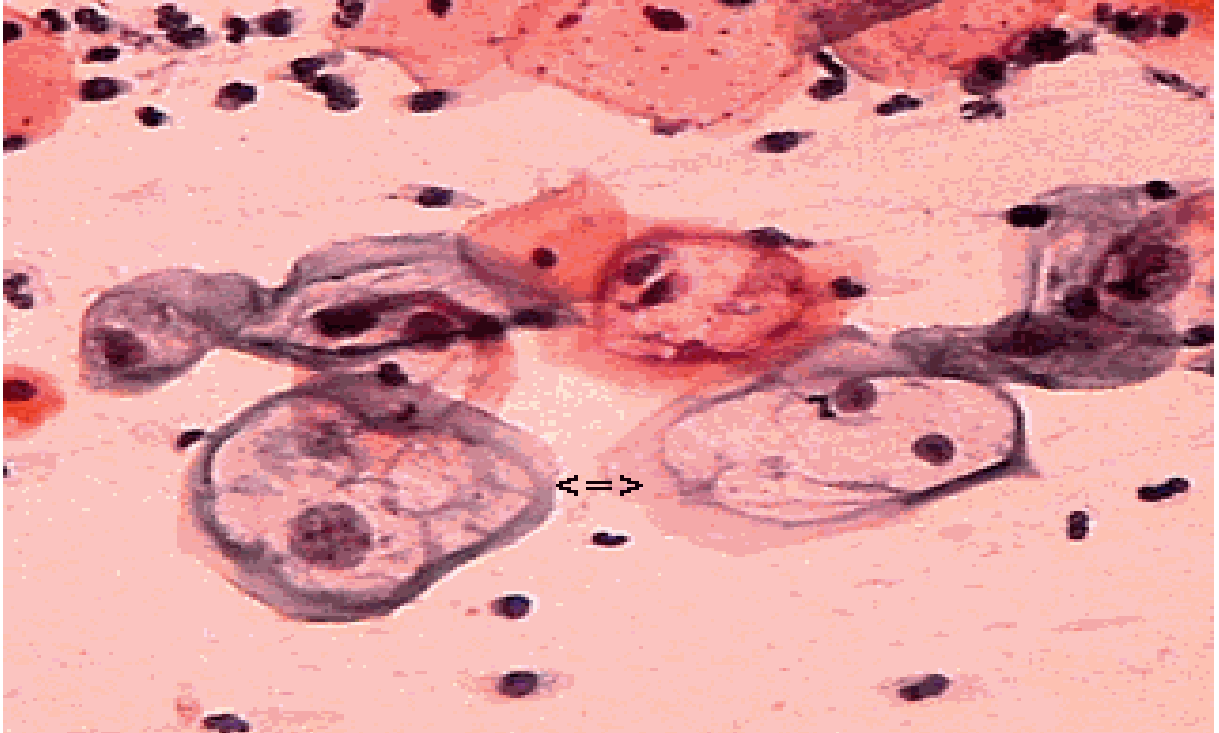
A infecção é decorrente da exposição de células basais ao vírus. Após o início da infecção o HPV pode permanecer sob a forma latente na camada basal sem causar nenhum tipo de alteração patológica. Entretanto, quando aparecem pequenas lesões clínicas como verrugas genitais se tornam indícios de infecção recente. O início da replicação viral acontece nas camadas parabasais seguida de

uma expressão gênica tardia no núcleo de células superficiais (ROSENBLATT et al., 2005).

#### 2.1.5 Aspectos subclínicos

A curiosidade em relação às alterações infecciosas se intensificou quando foram publicados os primeiros artigos sobre as lesões causadas pela infecção do HPV em mulheres. As primeiras descrições sobre as alterações celulares causadas por esse vírus no epitélio vaginal foi feita por Papanicolaou em 1933, no entanto, naquela época não se conhecia o agente etiológico como ele é considerado atualmente. Mesmo sem o conhecimento específico foi incorporado na literatura o termo “coilocitose atípica”, para anormalidades celulares encontradas em esfregaços cervicovaginais. Essas alterações se caracterizam por células apresentando halo perinuclear irregular e binucleação (Figura 3) (KOSS; DURFEE, 1956).

Figura 3 - Preparação citológica com a presença de *coilocitos*. Células apresentando zona perinuclear ampla e irregular. Núcleos aumentados e presença de binucleação.



Fonte: Atlas digital de citopatologia e histopatologia do colo uterino, Pró-Célula, disponível em: <<http://pro-celula.com.br>>. 2011.

No hospedeiro, o HPV induz tumores epiteliais e fibroepiteliais, eles apresentam um tropismo específico por células epiteliais basais. Uma vez que esta célula é a única do epitélio escamoso com capacidade de divisão, o vírus infecta esse tipo celular para induzir sua disseminação. Técnicas moleculares baseadas em hibridização *in situ* têm demonstrado ao longo dos anos a presença do DNA-HPV em células basais e parabasais do papiloma (SCHNEIDER et al., 1987).

A infecção pelo HPV é responsável por aproximadamente 92,9% das neoplasias intraepiteliais do trato genital inferior. Essas lesões intraepiteliais cervicais podem ocorrer na endocérvice ou na ectocérvice. A maioria surge no epitélio escamoso que reveste a ectocérvice. Essas lesões podem ser divididas em dois tipos: lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) (AIDÉ et al., 2009).

No epitélio escamoso, essas alterações são denominadas de lesões escamosas intraepiteliais cervicais (displasias na citologia e neoplasia intraepitelial cervical – NIC na histologia). Histologicamente as neoplasias são classificadas em três graus que dependem de sua extensão e gravidade: neoplasia intraepitelial

cervical (NIC) graus I, II e III. A NIC III, englobando o carcinoma *in situ*, é o último estágio antes do carcinoma invasor. Por este motivo, costuma ser usada como um ponto de corte em vários estudos epidemiológicos a fim de se testar tecnologias novas, candidatas a se tornarem ferramentas epidemiológicas na prevenção do câncer cervical. Já o termo displasia refere-se à presença de células atípicas que comprometem parte ou toda a espessura do epitélio. É dividida em leve, moderada e severa (Tabela 2) (SALVIA, 2004).

Tabela 2 - Equivalências entre as diferentes classificações do pré-câncer ginecológico.

<b>Displasia</b>	<b>Neoplasias intraepiteliais</b>	<b>Lesões intraepiteliais</b>
Displasia leve	Neoplasia intraepitelial grau 1 (NIC 1)	Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL)
Displasia moderada	Neoplasia intraepitelial grau 2 (NIC 2)	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)
Displasia severa	Neoplasia intraepitelial grau 3/ Carcinoma <i>in situ</i> (NIC 3)	Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL)

Fonte: Salvia, 2004.

A teoria que se fixou na década de 1960 era de que as alterações cervicais de alto grau decorriam da progressão de NIC I para NIC II e, conseqüentemente, para NIC III. Estas lesões comportavam-se como uma continuação gradativa, levando ao câncer de colo do útero. Porém, estudos longitudinais evidenciaram o surgimento da NIC III sem a detecção prévia de lesões de baixo grau, apesar da presença do HPV carcinogênico na maioria dessas lesões, as quais atuam de forma transitória na maioria dos casos. Suspeita-se que o comportamento biológico e as características morfológicas da NIC I são diferentes da NIC II e da NIC III (AIDÉ et al., 2009).

O padrão-ouro para o diagnóstico das neoplasias intraepiteliais cervicais é a histologia. Apesar das análises colposcópicas poderem sugerir a verificação do epitélio e indicar a localização de lesões de forma satisfatória, na maioria das situações é difícil localizar uma invasão incipiente por meio da colposcopia. O diagnóstico de invasão primária requer a combinação de ambos os indicadores, colposcópicos e histológicos (SALVIA, 2004).

### 2.1.6 Vacinas aplicadas ao HPV

Existe a necessidade de uma forma de prevenção primária contra a infecção pelo HPV através de vacinas, sendo considerada como a opção mais viável para a redução da mortalidade pelo carcinoma do colo do útero. A identificação do agente infeccioso como causa necessária do problema permite supor que a interferência na infecção poderia prevenir o desenvolvimento desta neoplasia. Historicamente, as vacinas constituem um excelente meio de prevenção de doenças causadas por agentes microbiológicos. Em longo prazo, o principal objetivo de uma vacina é erradicar o agente infeccioso, permitindo que essa própria solução não seja mais necessária (LOWY; FRAZER, 2003). Atualmente os principais tipos de alto risco oncogênico que são controlados por vacinas são o HPV-16 e o HPV-18, infelizmente a presença de outros tipos de alto risco, que não seja os dois citados anteriormente, faz com que não haja a prevenção através de vacinas (ROSENBLATT et al., 2005).

## 2.2 Biologia do HPV

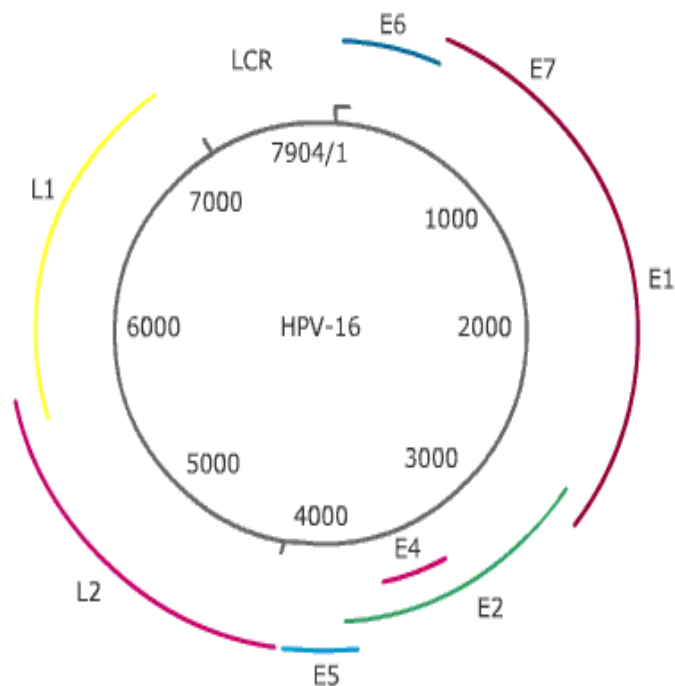
### 2.2.1 Estrutura molecular

O HPV é um vírus sem envelope e com forma icosaédrica; possui o genoma constituído de DNA dupla fita, sendo replicado no núcleo de células epiteliais escamosas. As partículas virais apresentam um diâmetro de 52 a 55nm e consistem numa única molécula de DNA circular de hélice dupla com aproximadamente 8kb, situada dentro de uma proteína esférica, a cápside, que é composta por 72 capsômeros e duas proteínas estruturais: a proteína do capsídeo maior ( $L_1$ ), de 55kD representando 80% da proteína total viral, e a proteína menor ( $L_2$ ) de peso molecular de 70kD (CASTRO et al., 2009). A  $L_2$  tem importância no envelopamento do material genético do vírus e, portanto, provoca o aumento da infectividade do HPV. O DNA, como um todo, é dividido em três regiões: região regulatória (*Long Control Region* – LCR), região precoce (*Early* –  $E_1$  a  $E_8$ ) e região tardia (*Late* –  $L_1$  e  $L_2$ ). Os genes “L” são responsáveis pela codificação das proteínas

do capsídeo viral e os genes “E” codificam proteínas com funções reguladoras de atividade celular (Figura 4) (SCHOELL, 1999).

Os genomas da maioria dos HPVs já foram sequenciados e possuem uma organização genômica bastante singular. Uma característica comum entre os papilomavírus é a localização das ORFs (*open reading frame*) numa mesma fita do DNA viral. São regiões que contém sequencias de bases que podem codificar proteínas. Estudos de transcrição revelaram que os RNAs são codificados por uma única fita do DNA que serve como molde de transcrição. A fita que codifica o RNA contém aproximadamente dez ORFs classificadas em precoces (E) e tardias (L). A única região que não contém ORFs é a LCR. Essa região varia de tamanho entre os papilomavirus, mantendo uma média de 1kb (ROSENBLATT et al., 2005).

Figura 4 - Esquema mostrando o genoma do HPV-16 com 7904 pb e as respectivas regiões onde se localizam as ORFs (*open reading frame*) na sequência.



Fonte: Kolposkopia, disponível em: <<http://kolposkopia.pl>>. 2011.

### 2.2.2 Ciclo molecular da infecção

Acredita-se que a infecção do HPV ocorre através de microtraumas ocorridos no epitélio, expondo as células basais à entrada do vírus. Durante o

processo da divisão celular, essas células deixam a camada basal e migram para a região suprabasal onde começa a diferenciação. Os queratinócitos terminam seu ciclo celular logo que são destacados do pavimento membranal; as células infectadas por HPV entram na fase de síntese do DNA no ciclo celular quando o vírus atinge a camada suprabasal. A entrada na fase de síntese resulta na amplificação do genoma viral em mil cópias por célula. Junto com a amplificação do DNA existe a formação das proteínas  $E_1$  e  $E_4$  juntamente com as proteínas do capsídeo  $L_1$  e  $L_2$ , resultando na formação dos agentes infecciosos. Concomitantemente esses agentes são liberados ao ambiente na camada superior, onde o epitélio é descamado (ROSENBLATT et al., 2005).

Nas lesões cervicais não cancerígenas o genoma do HPV se encontra sobre a forma episomal (circular). Porém nos carcinomas de colo do útero o DNA viral se encontra de forma integrada ao material genético celular acelerando o processo de malignidade. Esse processo vai se caracterizar pela perda da função do gene  $E_2$  do vírus. Esse gene possui a função de inibição dos principais oncogenes  $E_6$  e  $E_7$  (JEON et al., 1995).

A entrada do vírus e a desintegração de seu envelope se tornam completas em cerca de 90 minutos. Os receptores pelos quais o HPV se liga a célula ainda não foram identificados. Alguns estudos indicam que a expressão da integrina  $\alpha$ -6 em uma linhagem celular negativa pra essa proteína já é o suficiente para que ocorra a ligação do papilomavírus à célula, evidenciando a integrina  $\alpha$ -6 como candidato ao receptor do HPV. Através de microscopia eletrônica nenhum vírus completo foi observado no interior do núcleo de células infectadas, apesar da fluorescência indicar a presença das proteínas  $L_1$  e  $L_2$ . Essa observação sugere que o HPV é desintegrado ainda no citoplasma e que a presença de  $L_1$  e  $L_2$  é devido a um sinal de localização nuclear fazendo com que migrem até o núcleo (ZHOU et al., 1995).

A transcrição do papilomavírus se baseia em múltiplos promotores com padrões de recomposição alternativa dos exons (*splicing*) produzindo diferentes espécies de RNA mensageiros (RNAm). O HPV-16 e o HPV-31 são exemplos atuantes. O promotor  $P_{97}$  (nucleotídeo na posição 97) é dominante em células diferenciadas. Tal promotor atua na expressão das proteínas  $E_6$  e  $E_7$ . Da mesma forma, funcionando como análogo, o  $P_{105}$  atua no HPV-18 (ROSENBLATT et al., 2005).



As funções da maioria dos genes precoces parecem estar definidas de acordo com a atividade viral. Estudos genéticos demonstraram que a replicação do cromossomo do papilomavírus na forma epissomal depende da expressão das proteínas virais  $E_1$  e  $E_2$ . Sendo a proteína  $E_1$  o único fator viral diretamente envolvido da replicação. A  $E_2$  funciona auxiliando esse processo e atuando na manutenção do DNA circular. A interação da  $E_1$  com a origem da replicação possuem uma baixa afinidade, porém a ligação se torna estabilizada pelo complexo  $E_1/E_2$ . O gene  $E_4$  tem uma expressão tardia e um papel na infecção produtiva. O  $E_4$  sobrepõe-se com a ORF  $E_2$  em outra região codificadora, portanto, resulta em uma proteína totalmente diferente com distinta sequência de aminoácidos. Apesar da  $E_4$  ser encontrada em grandes níveis nos tecidos infectados, sua função ainda não está devidamente elucidada (SEO et al., 1993).

A proteína  $E_5$  não possui atividade enzimática intrínseca. É responsável pela alteração da atividade protéica membranal envolvida na proliferação celular, afetando a atividade e metabolismo de receptores para fatores de crescimento. As principais oncoproteínas relacionadas com a infecção do HPV são a  $E_6$  e  $E_7$ . São responsáveis pela inibição de genes supressores de tumor, considerados os “guardiões do genoma”. A inibição da atividade desses genes irá desencadear uma replicação desorganizada, levando a um processo cancerígeno (OZBUN, 2002).

## 2.3 Carcinogênese do HPV

### 2.3.1 Alterações pré-cancerígenas

O potencial carcinogênico do HPV foi relatado inicialmente através da observação da transformação maligna de papilomas de coelhos. De acordo com essa análise e comparando-a com condilomas humanos, verificaram a possibilidade de um precursor do câncer epidermóide (ROUS; BEARD, 1935).

Até o ano de 1976 a hipótese do diagnóstico era obtida somente na presença de lesões verrugosas que atingissem as partes genitais externas, facilmente observáveis a olho nu. Foi necessária, então, a descrição minuciosa do padrão citológico das lesões condilomatosas da cérvix uterina e vaginal, obtendo os conhecimentos expostos na literatura atual (MEISELS; FORTIN, 1976).

Nos últimos 20 anos o conhecimento sobre os mecanismos do HPV e a sua função no desenvolvimento de cânceres genitais e de outras regiões cresceu drasticamente. Somente a presença desse vírus não é suficiente para induzir a criação de carcinomas, entretanto, se torna um fator indispensável. Existem outros fatores que contribuem para essa formação como o quadro persistente da doença, tabagismo, presença de outras DSTs, imunossupressão, fatores genéticos e principalmente o tipo de HPV que está causando o problema (ROSENBLATT et al., 2005).

Algumas mulheres desenvolvem infecção persistente pelo HPV, talvez devido à baixa imunidade. Em quadros assim é comum encontrar tipos virais mais frequentemente associados a precursores de atividade oncogênica, progredindo para lesões mais graves. Apesar de 99,7% das neoplasias invasoras de colo uterino apresentar a presença do DNA viral, apenas 1% das mulheres infectadas pelos diversos tipos virais, possui o risco de desenvolvimento de câncer. O HPV também está intimamente relacionado com outros tipos de cânceres: ânus, pênis, vulva e vagina. No entanto, esses tumores são raros quando comparados ao câncer cervical. Algumas lesões desenvolvidas pelo HPV costumam aparecer aproximadamente uma década após o momento inicial da infecção, permitindo o conhecimento através de recursos diagnósticos (FERENCZY, 1995).

É válido ressaltar que o diagnóstico do HPV possui uma elevada positividade entre mulheres de 18 a 28 anos. Já o câncer de colo de útero, decorrente dessa infecção, é bastante comum, acometendo mulheres acima dos 39 anos (Sociedade Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2002).

O desenvolvimento de uma malignidade resultante da expressão de alguns genes do HPV mostra-se através de uma evolução do quadro que se estende de um epitélio normal ao epitélio neoplásico. Essa progressão passa por alguns estágios (pré-câncer) antes de se tornar um carcinoma invasor. (ROSENBLATT et al., 2005).

Quando há o desenvolvimento de uma lesão de baixo grau (displasia leve) para alto grau (displasia moderada, severa e carcinoma *in situ*) ocorre também uma alteração na relação do DNA viral com a célula. O DNA que estava na forma episossomal (circular) passa a se incorporar ao DNA genômico da célula hospedeira. Esse processo de incorporação frequentemente causa a ruptura da região  $E_2$ , uma

vez rompida deixa de ocorrer a inibição da  $E_2$  sobre a expressão de  $E_6$  e  $E_7$ , levando a degradação de supressores tumorais (MUÑOS et al., 2003).

### 2.3.2 Genes e o câncer cervical

Para iniciar um processo cancerígeno é preciso que ocorra um acúmulo de mutações em replicações celulares futuras. As mutações são mudanças nas sequencias dos nucleotídeos do material genético de um determinado organismo, nesse caso, da mulher. Francis S. Collins (2010) relatou os 3 principais tipos de genes que estão relacionados com a carcinogênese devido à mutação:

- a) Oncogenes: são genes que codificam proteínas que promovem o crescimento celular. Todos possuem esse tipo de gene na forma de proto-oncogenes, atuando em lesões corporais e replicação celular normal. Uma mutação nessa região causaria a sua transformação em oncogenes, exacerbando a sua atividade causando uma mitose anárquica, um crescimento desenfreado do número de células. Esses genes codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico e levam as células a se tornarem cancerígenas, esses genes resultam de mutações somáticas dominantes. A ativação dos proto-oncogenes em oncogenes pode ser desencadeada pelos seguintes fatores: translocações, deleções envolvendo genes supressores, mutações e inserções.
- b) Genes de supressão tumoral: esses possuem a capacidade de desaceleração do crescimento celular quando o considerarem irregular. Uma alteração nos nucleotídeos irá causar à perda da função, fazendo com que as células se repliquem sem controle. Para que esse problema ocorra é preciso que a mutação exista nos dois alelos (cópias) do gene, devido à diploidia. Um exemplo que possui relação com a infecção pelo papilomavírus é o gene *p53*.
- c) Genes do mecanismo de reparo do DNA: são genes que comparam uma fita à outra verificando a possibilidade de erros. Eles atuam na reparação do problema. Numa eventual perda dessa função sequencias acabam

sendo inseridas ou deletadas no genoma sem a correção, podendo levar a uma malignidade.

O gene  $E_6$  presente no DNA de HPVs de alto risco é responsável pela codificação de uma proteína de 150 aminoácidos, que por sua vez irá se ligar ao supressor tumoral  $p53$ , resultando em sua degradação. A proteína  $p53$  é expressa pelo seu gene em resposta a agentes citotóxicos que provocam a instabilidade genômica, causando a interrupção do ciclo celular ou apoptose. A proteína do gene  $E_7$  utiliza o mesmo princípio da  $E_6$  para a inibição da ação da proteína de outro gene supressor de tumor, o  $pRb$ . O potencial do HPV em degradar esse gene e suas respectivas funções acarretará em uma divisão celular não controlada levando ao processo carcinogênico (COLLINS, 2010).

#### **2.4 Co-infecções com outros tipos de HPV**

Algumas observações demonstraram que em pacientes imunologicamente comprometidos (Portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e transplantados) existe mais de um tipo de HPV numa frequência maior do que nos pacientes normais. Há uma possibilidade de que esses mesmos pacientes possam apresentar um quadro de co-infecção com variações dos tipos de HPV (BROW et al., 1994).

A associação entre diferentes tipos virais pode ser classificada em concorrente ou sequencial, geralmente ocorre através de dois tipos de HPVs relacionados filogeneticamente. As co-infecções são mais frequentes do que se supõe e o risco de uma nova infecção por outro tipo de HPV (sequencial) não se torna menor devido à presença da infecção inicial (THOMAS et al., 2000).

Provas recentes indicam que a co-infecção está presente em 3% das mulheres sem alterações clínicas, podendo se tornar maior em mulheres que apresentam um quadro de citologia oncótica cervical alterada, ao mesmo tempo esse risco declina com a idade. Para o homem a incidência de co-infecção existe na prática clínica, mas ainda não permanece clara, não se sabe exatamente quais são os mecanismos e causas deste problema (ROSENBLATT et al., 2005).

## 2.5 Rastreamento do DNA-HPV

A detecção do DNA do HPV possui sua importância tanto na sensibilidade de seu diagnóstico quanto na especificidade da genotipagem. A identificação genotípica é de extrema relevância devido ao desenvolvimento de riscos distintos conferidos por cada tipo de HPV na evolução das lesões e/ou no câncer de colo do útero. O conhecimento da prevalência e dos riscos associados a cada tipo de HPV também tem sido essencial para o desenvolvimento de vacinas contra esse agente. Todas essas informações são aplicadas para o monitoramento dos programas de vacinação e para documentar a redução da prevalência de um tipo específico de papilomavírus (SÖDERLUND-STRAND et al., 2008).

Se existe uma negatividade para a presença do DNA-HPV se torna improvável que aquela paciente desenvolva um quadro cancerígeno pelos próximos anos. Por outro lado existe uma necessidade real para o monitoramento de pacientes tratadas para NIC (SÖDERLUND-STRAND et al., 2005).

Anteriormente, em programas de rastreamento do câncer cervical, o DNA do HPV era normalmente detectado por um método não radioativo de amplificação de sinal, o sistema de captura híbrida. Este método permite a detecção de até 13 tipos de alto risco e 5 tipos de baixo risco oncogênico, utilizando sondas de RNA que se hibridizam em regiões específicas do DNA-HPV. Após a aprovação da FDA (Food and Drug Administration) a captura híbrida tornou-se o padrão para a detecção do HPV, no entanto este sistema possui algumas limitações relevantes, deixando de fornecer informações sobre o tipo de HPV, tornando-se um método menos sensível do que a PCR. O método de amplificação de DNA foi desenvolvido para aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção do material genético, conseqüentemente pode ser aplicado para DNA-HPV. A maioria dos protocolos utiliza dois conjuntos de iniciadores, MY09 e MY11, que atuam amplificando uma região hipervariável do gene  $L_1$ , sendo capazes de detectar diversos genótipos em uma mesma reação (NOBRE et al., 2008).

Metodologias aplicadas após a PCR, como o Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) e o sequenciamento de DNA auxiliaram na tipagem e identificação de inúmeros tipos de papilomavírus. O uso da metodologia de RFLP que se baseia em padrões de cortes do DNA utilizando endonucleases de restrição se tornou comum pelo seu excelente custo-benefício e

especificidade ao se observar um algoritmo de genotipagem original, onde pode ser apresentado um padrão de corte diferente para cada tipo de HPV utilizando algumas enzimas (GONÇALVES et al., 2008).

A base da genotipagem dos tipos e subtipos virais surgiu com a automação das técnicas moleculares, que apesar do alto custo, foi obtida uma grande praticidade em relação às antigas metodologias. O sequenciamento, com a digitalização de uma informação biológica, permitiu a manipulação de dados *in silico*, mantendo um padrão extremamente fidedigno com a agregação de softwares e ferramentas computacionais. O que diferencia os tipos de HPV são as similaridades de no máximo 90% na sequência do gene  $L_1$ . A igualdade de bases entre 90 a 98% indicam os subtipos existentes, enquanto que as variantes de um determinado tipo de HPV se tornam presentes quando a similaridade de bases é maior que 98%. Essas informações são extremamente importantes quando o objetivo é comparar as sequências obtidas com as depositadas no banco de genomas online, o *GenBank*. O estudo do sequenciamento é um novo método de genotipagem do papilomavírus, podendo ser aplicado em uma rotina laboratorial melhorando a especificidade e eliminando as possíveis dificuldades (LEE et al., 2009).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

- Identificar através de PCR e sequenciamento do DNA os tipos virais do Papilomavírus Humano e sua frequência numa amostra de mulheres da população do Estado de Alagoas.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Realizar a genotipagem do HPV utilizando as técnicas de PCR, sequenciamento do DNA viral e o alinhamento *BLAST*;
- Identificar quais os tipos de HPV mais frequentes em uma amostra de mulheres da população de Alagoas;
- Identificar a presença de co-infecções.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos deste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), e aprovados conforme parecer de nº 004650/2010-55 com base no item VIII.13, b, da Resolução nº196/96.

### 4.1 Descrição da Amostra

#### 4.1.1 Características gerais da amostra

Foi analisada uma amostra constituída de 515 voluntárias que concordaram em se submeter à pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) para doação de amostra cervico-vaginal. Todas as participantes foram devidamente esclarecidas pelos pesquisadores sobre o estudo em tela, valendo-se de linguagem acessível para instruções e preenchimento do respectivo termo. A amostra é constituída de 2 grupos distintos: o de pacientes atendidas em serviço de ginecologia privado (Clínica de Colposcopia e Citologia Dr<sup>a</sup>. Anália Lôbo) e o das pacientes atendidas em serviço público (Posto de Atendimento Médico Salgadinho) (Tabela 3).

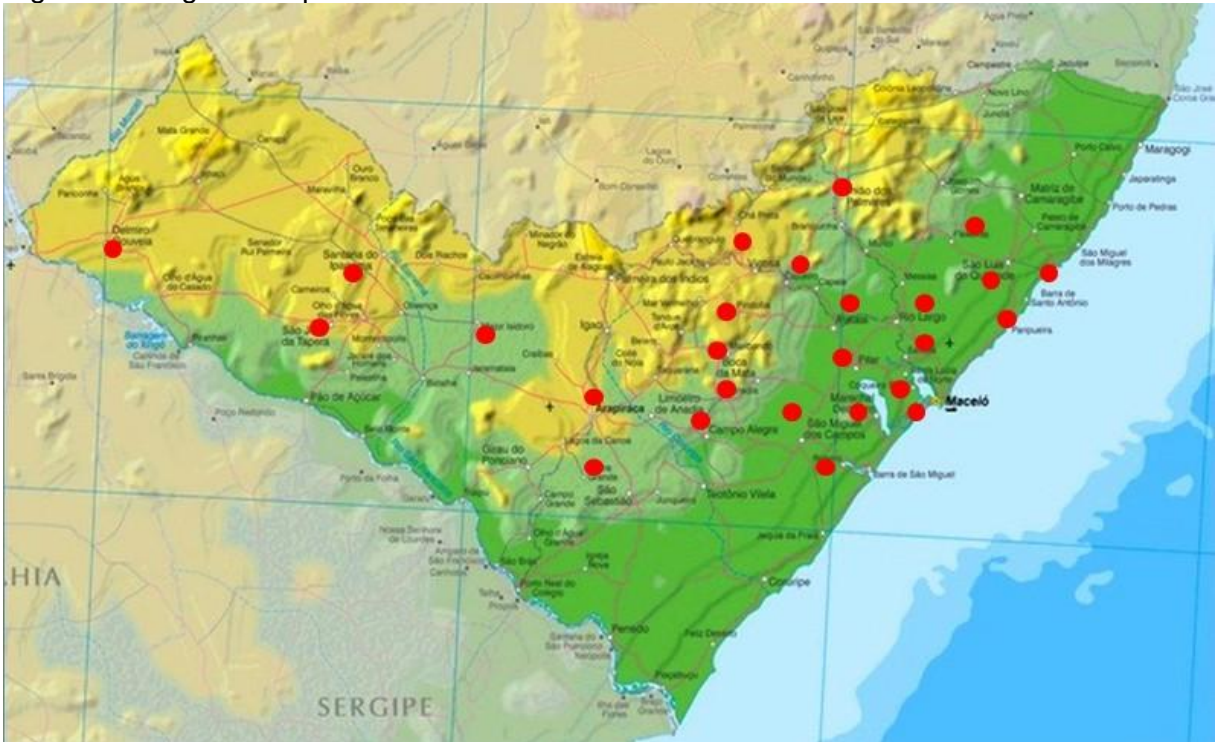
Tabela 3 - Divisão do número de coletas e os respectivos locais de atendimento dos serviços de ginecologia.

Local	Número de coletas
Posto de Atendimento Médico Salgadinho	339
Clínica de Colposcopia e Citologia Dr <sup>a</sup> . Anália Lôbo	176

A maior parte da amostra é de pacientes voluntárias que foram atendidas no PAM Salgadinho. São pacientes que vieram de cidades localizadas no interior do Estado. A finalidade foi a obtenção de um quadro amplo para uma epidemiologia molecular da infecção pelo HPV (Figura 5).



Figura 5 - Mapa político-administrativo do Estado de Alagoas sinalizando a localização das regiões de origem das pacientes voluntárias.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011.

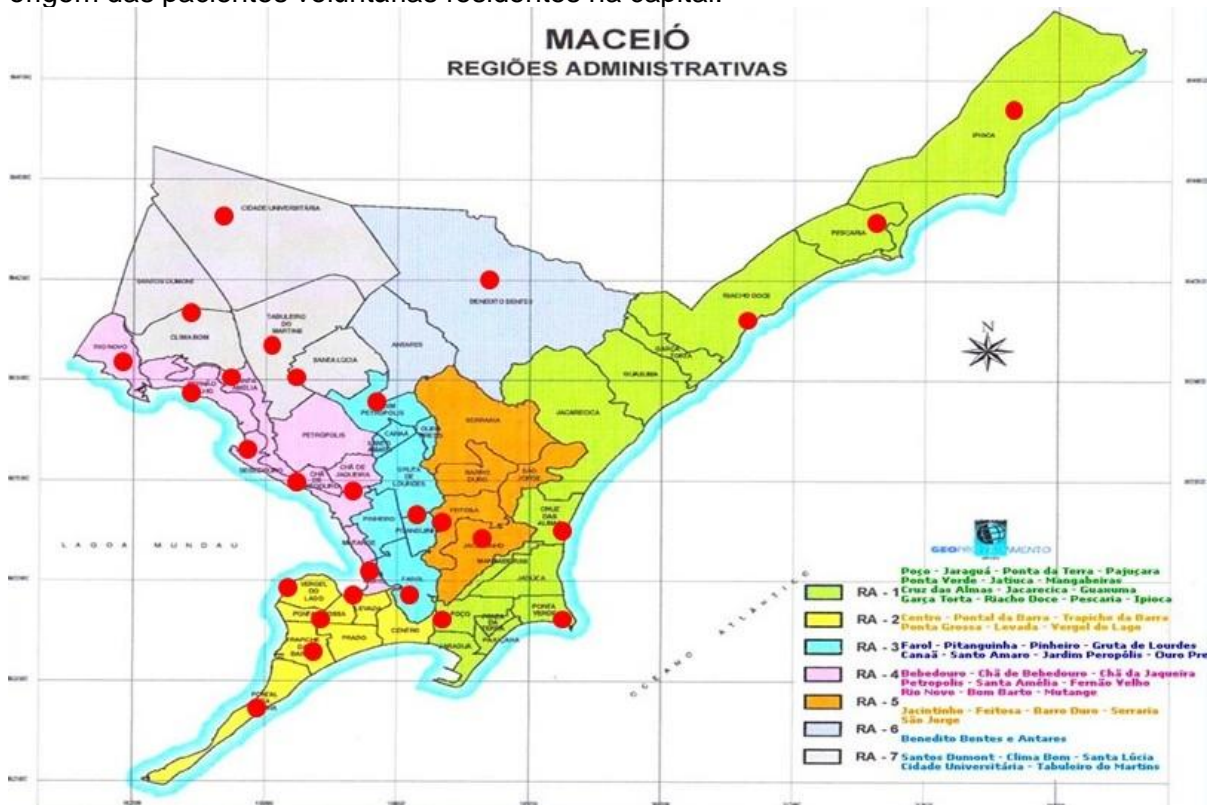
#### 4.1.2 Critérios de inclusão da amostra

Para os grupos foram aceitas as voluntárias de qualquer faixa etária com vida sexualmente ativa e que procuraram os serviços de ginecologia descritos acima.

#### 4.1.3 Formação da amostra

As pacientes foram convidadas a participar da pesquisa logo após realizarem as consultas com as Médicas colaboradoras responsáveis pelo serviço de ginecologia no Centro de Atendimento à Mulher do PAM Salgadinho e do Centro de Citologia e Colposcopia Dra. Anália Lobo. A metodologia, objetivos e a participação foram explicados de forma detalhada e, após o consentimento das pacientes, iniciou-se o preenchimento de um questionário (APÊNDICE B), que incluía as regiões de origem das voluntárias na capital e no interior e algumas informações relevantes ao estudo (Figura 6).

Figura 6 - Mapa das regiões administrativas da cidade de Maceió sinalizando os bairros de origem das pacientes voluntárias residentes na capital.



Fonte: Bairros de Maceió, disponível em: <<http://bairrosdemaceio.net>>. 2011.

Em seguida foi feita a coleta da amostra com um Kit específico para Papilomavírus Humano, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* seguindo as especificações do fabricante (Digene Corporation, Gaithersburg, Md.). Esse Kit contém cerca de 1mL de um líquido estabilizador de ácidos nucleicos e uma escova endocervical utilizada para a obtenção de material da endocérvix e ectocérvix. Foram seguidas as normas técnicas e éticas aplicáveis aos procedimentos de coleta. As mesmas médicas ficaram responsáveis pelo resultado da citologia oncológica e pelo exame colposcópico para posterior comparação com as técnicas moleculares aplicadas. O material coletado foi armazenado e enviado ao Laboratório de Genética Forense da UFAL para análise. Os espécimes eram mantidos a 4°C até o procedimento posterior.

## 4.2 Rastreamento do DNA do Papilomavírus Humano

### 4.2.1 Extração de DNA

A amostra foi submetida à extração do DNA genômico seguindo o protocolo padrão para o método orgânico. Após a transferência do material contido na escova para o líquido estabilizador presente no Kit de coleta, 300µL foram transferidos para um tubo de 2mL e acrescentados 300µL de solução de extração (10mM Tris, HCl pH 8,0 e 0,1mM de EDTA) seguido de 3µL de proteinase K (Invitrogen) para a digestão enzimática. As soluções foram colocadas em banho maria a 56° C por 1 hora, agitando-se o material a cada 20 minutos. Em uma capela de exaustão, foram acrescentados 600µL de uma solução contendo Fenol/Clorofórmio 1:1, a mistura foi homogeneizada manualmente por 3 minutos. Centrifugou-se por 3 minutos a 14.000g e a fase aquosa contendo o DNA foi retirada (500 a 600µL) para outro tubo de 1,5mL. Esse processo de lavagem com Fenol/Clorofórmio foi repetido com o objetivo aumentar a eficiência da extração. Para a precipitação do DNA foi usado isopropanol em igual proporção, homogeneizado e incubado por 20 minutos a -20°C. Uma nova centrifugação foi feita por 12 minutos a 14.000g, descartando-se o sobrenadante por inversão. Foi acrescentado 600µL de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 5 minutos a 14.000g e descartando novamente o sobrenadante por inversão. O precipitado foi solubilizado em 60µL de TE com pH 8.0 e armazenado a -20°C até a etapa de amplificação.

### 4.2.2 Reação de amplificação

O DNA purificado das amostras foi submetido inicialmente à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para cada reação 1X tampão de PCR (10mM/l Tris-HCL, pH 8,0, 50mM/l KCL, 2mmol/l MgCl<sub>2</sub>), 50mM de dNTP, 0,625µM de *primers*, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) formando um volume total de 20µL. Para a amplificação da região alvo foram utilizados 2 conjuntos de *primers* consensos, específicos para papilomavírus: MY09 e MY11, cada conjunto contendo 8 marcadores responsáveis pela amplificação de uma região do gene *L<sub>1</sub>* contendo 450 pb (Tabela 4). As condições de termociclagem

foram realizadas de acordo com Nobre *et al.*, 2008, com uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos com posterior extensão final a 72°C por 8 minutos.

Tabela 4 - MY09 e MY11. Conjuntos de *primers* consensos utilizados para a amplificação da região alvo presente no gene *L<sub>1</sub>* do Papilomavírus Humano.

	INICIADORES	SEQUENCIAS
MY09	MY09 A	5' - CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC - 3'
	MY09 B	5' - CGT CCA AAA GGA ATC TGA TC - 3'
	MY09 C	5' - CGT CCA AAG GGA AAC TGA TC - 3'
	MY09 D	5' - CGT CCA AAG GGA ATC TGA TC - 3'
	MY09 E	5' - CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC - 3'
	MY09 F	5' - CGT CCC AAA GGA ATC TGA TC - 3'
	MY09 G	5' - CGT CCC AAG GGA AAC TGA TC - 3'
	MY09 H	5' - CGT CCC AAG GGA ATC TGA TC - 3'
MY11	MY11 A	5' - GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG - 3'
	MY11 B	5' - GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG - 3'
	MY11 C	5' - GCA CAG GGT CAT AAC AAT GG - 3'
	MY11 D	5' - GCA CAG GGT CAT AAT AAT GG - 3'
	MY11 E	5' - GCC CAG GGA CAT AAC AAT GG - 3'
	MY11 F	5' - GCC CAG GGA CAT AAT AAT GG - 3'
	MY11 G	5' - GCC CAG GGT CAT AAC AAT GG - 3'
	MY11 H	5' - GCC CAG GGT CAT AAT AAT GG - 3'

Fonte: Nobre *et al.*, 2008; Gravitt *et al.*, 2000; Kaneshima *et al.*, 2001; Wanderlei-Silva *et al.*, 2005.

#### 4.2.3 Eletroforese em gel para a detecção de amostras positivas

O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2% para confirmação da eficiência dos conjuntos de *primers* utilizados na reação, comprovando a hibridização dos iniciadores com a região alvo. Neste ensaio foi utilizado 3µL de um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), um controle positivo para a comprovação da eficiência da amplificação e um controle negativo para a detecção de uma possível contaminação ou dimerização dos marcadores. Foram adicionados 3µL do material amplificado na etapa anterior. O DNA foi corado com brometo de etídio (250µg/mL) e observado em transiluminador UV (Vilber Lourmat). O protocolo foi repetido nos indivíduos que apresentaram baixa intensidade das bandas, confirmando a positividade.

### 4.3 Sequenciamento do DNA

#### 4.3.1 Purificação dos produtos da reação de PCR

A purificação é necessária para eliminar os iniciadores e dNTPs excedentes na reação de PCR, evitando a competição por sítios de ligação entre o DNA e os *primers* na reação de sequenciamento.

A preparação foi purificada por precipitação com isopropanol/etanol de acordo com o seguinte protocolo:

- a) Foram adicionados 72 $\mu$ L de isopropanol a 65% aos 20 $\mu$ L de *amplicons* ainda acondicionados em tubos de 0,2mL, procedendo-se uma agitação manual de 30s e transferência de todo o conteúdo para tubos de 1,5mL. A preparação foi então deixada em repouso por 20 minutos;
- b) Centrifugação por 15 minutos a 14.000g, seguida de descarte do sobrenadante por pipetagem;
- c) Ao precipitado foram acrescentados 250 $\mu$ L de álcool etílico a 60%, seguido de um período de repouso de 5 minutos;
- d) Posteriormente nova centrifugação por 5 minutos a 14.000g. Logo após o sobrenadante foi descartado por pipetagem;
- e) Após a completa secagem dos tubos, o precipitado foi ressuscitado com 15 $\mu$ L de TE (10mM de Tris - HCl pH = 8,0 e 0,1mM de EDTA).

#### 4.3.2 Quantificação do DNA

Tendo como finalidade a padronização da concentração de DNA, foi utilizado gel de agarose 2% para a comparação das amostras com um marcador de tamanho e peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, CA, USA). A quantificação do DNA é fundamental para a construção das reações de sequenciamento, já que o excesso de DNA pode vir a gerar dados brutos com picos saturados no gráfico da eletroforese capilar, prejudicando a análise. Por outro lado, baixa quantidade de DNA reduz a intensidade do sinal, podendo aparecer um aumento do nível da perturbação/ruídos evitando o aparecimento dos picos (Barbosa, 2006). Tomando por base o tamanho do fragmento do gene *L<sub>1</sub>*

amplificado, a concentração ideal para o sequenciamento é de 3 a 10 ng. A Tabela 5 mostra as quantidades recomendadas de DNA para a reação de sequenciamento (Applied Biosystems, 2000).

Tabela 5 - Quantidades de DNA recomendadas para as reações de sequenciamento.

<b>Amplicons – Tamanho dos fragmentos</b>	<b>Quantidade a ser utilizada</b>
100 a 200 pb	1 a 3 ng
200 a 500 pb	3 a 10 ng
500 a 1000 pb	5 a 20 ng
1000 a 2000 pb	10 a 40 ng
> 2000 pb	40 a 100 ng

Fonte: Applied Biosystems, 2000.

#### 4.3.3 Reação de sequenciamento e purificação do produto

Para a construção dessa reação e posterior sequenciamento do DNA viral foi utilizado o kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento para a eletroforese capilar foram feitas em um volume final de 10 $\mu$ L, incluindo: 2,5 $\mu$ L de Big Dye *reaction mix* (Applied Biosystems); 2,0 $\mu$ L Big Dye 5X *sequencing buffer* (Applied Biosystems); 2,0 $\mu$ L de mix de iniciadores (0,075 $\mu$ M MY09); 1,5 $\mu$ L de produto de PCR purificado e H<sub>2</sub>O (qsp). A termociclagem foi executada com uma rampa térmica de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, durante 25 ciclos. Para a complementação e confirmação da análise do sequenciamento foram escolhidas 10 amostras para a realização do sequenciamento reverso, utilizando o grupo de marcadores MY11.

Após esse procedimento foi realizada uma nova purificação a fim de eliminar os corantes fluorescentes que não foram incorporados, evitando obscurecer partes do eletroferograma e a diminuição da qualidade do sequenciamento (Barbosa, 2006). Seguindo as etapas do protocolo anterior de purificação, com alteração no tempo da primeira centrifugação, aumentando de 15 para 25 minutos a 14.000g. Após a secagem das amostras, o precipitado foi ressuspendido em 10 $\mu$ L de formamida Hi-Di<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) e armazenada a -20°C até a etapa de sequenciamento.

#### 4.3.4 Eletroforese Capilar

Os produtos da reação de sequenciamento foram detectados por eletroforese capilar utilizando o analisador genético ABI 310 (Applied Biosystems). As amostras foram preparadas e inseridas pela adição da quantidade total das reações ressuspendidas.

Na técnica foi usado um capilar de 47 centímetros, polímero POP-4 (Applied Biosystems) e utilizados os demais parâmetros analíticos: tempo de corrida de 30 minutos, módulo de corrida “P4 RapidSeq (1mL) E.md4” e matriz “MatrixBDv<sup>3</sup>\_151003.mtx”. As sequências resultantes obtidas foram analisadas com o software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas que apresentaram sobreposição de picos foram re-feitos para a confirmação e considerados como co-infecção segundo os estudos de Carvalho (2009).

### 4.4 Ensaios *in silico*

#### 4.4.1 Alinhamento *BLAST*

Para a tipagem genética do papilomavírus tornou-se conveniente a administração de técnicas de bioinformática e o auxílio de softwares específicos para o estudo das sequências obtidas. Essas sequências foram copiadas do programa Sequencing Analysis v.5.2.0 e aplicadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esse centro online possui diversas ferramentas pertinentes ao estudo, entre elas, a presença de um banco de genomas de diversos organismos identificados e do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

O alinhamento alcançado pelo *BLAST* possibilita uma comparação das sequências obtidas com as já depositadas na biblioteca genômica. Dessa forma foram identificados por similaridade os tipos de HPVs que foram rastreados nas amostras coletadas.

#### 4.4.2 Obtenção do padrão de restrição *in silico*

Outras pesquisas com tipagem de papilomavírus demonstraram a eficiência da Reação em Cadeia da Polimerase associada ao Polimorfismo de Comprimento dos fragmentos de Restrição (PCR-RFLP). Foi descoberto, então, um Algoritmo de Genotipagem Original, onde cada tipo de HPV possuía o seu mapa de restrição individual (NOBRE et al., 2008). Seguindo os mesmos princípios, para complementar os resultados obtidos após o sequenciamento, foi utilizado o programa pDRAW32 (AcaClone Software). Essa ferramenta permite a obtenção de um padrão de restrição digital, quando aplicadas as sequencias obtidas. O software possibilitou a análise de dados *in silico* a partir dos seguintes ensaios: representação da sequencia demonstrando a quantidade de pares de base com os sítios de restrição das enzimas aplicadas e simulação de um gel digital expondo o padrão de restrição das amostras. Neste programa foram aplicadas nas simulações as mesmas enzimas utilizadas em técnicas de PCR-RFLP para HPV: *Dde I*, *Rsa I*, *Pst I* e *Hae III*. Comparando os dados *in silico* com o algoritmo de genotipagem presente na literatura.

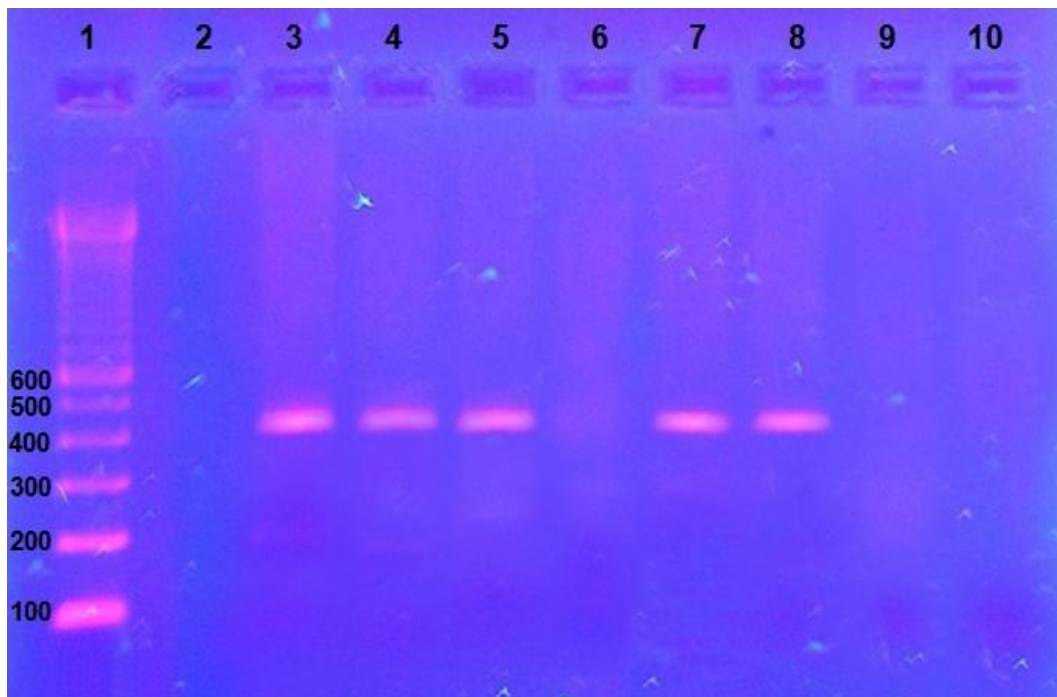


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Diagnóstico Positivo do Papilomavírus Humano

Baseando-se nos levantamentos efetuados anteriormente e seguindo as principais metodologias de diagnóstico, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo para a identificação dos casos positivos. Após a realização da PCR com os iniciadores específicos, foram administrados os *amplicons* no gel. Os materiais genéticos amplificados foram identificados através da visualização de um fragmento contendo 450 pb quando comparado com o marcador de peso molecular (Figura 7). Os testes iniciais serviram para a verificação da eficiência de protocolo e escolha de amostras que foram utilizadas como controle padrão durante todo o rastreamento.

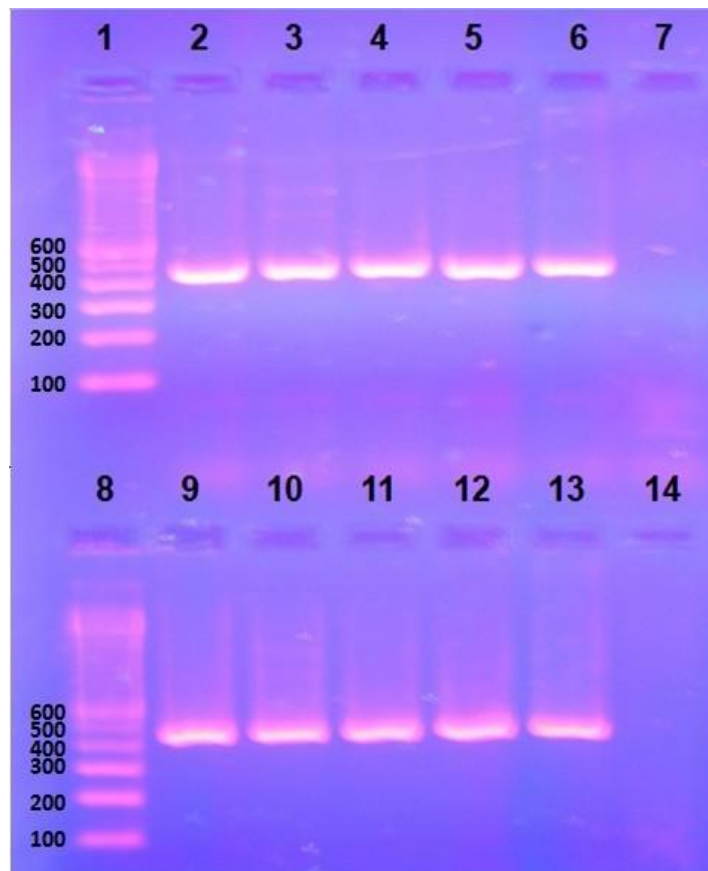
Figura 7 - Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os casos positivos são identificados pela presença do fragmento de DNA contendo 450 pb: **(1)** Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). **(2)** Vazio. **(3)** Controle positivo. **(4, 5, 7, 8)** Amostras positivas. **(6 e 9)** Amostras negativas. **(10)** Controle negativo.



Para complementar os resultados obtidos por esse ensaio, os fragmentos que apareceram com baixa intensidade das bandas foram refeitos

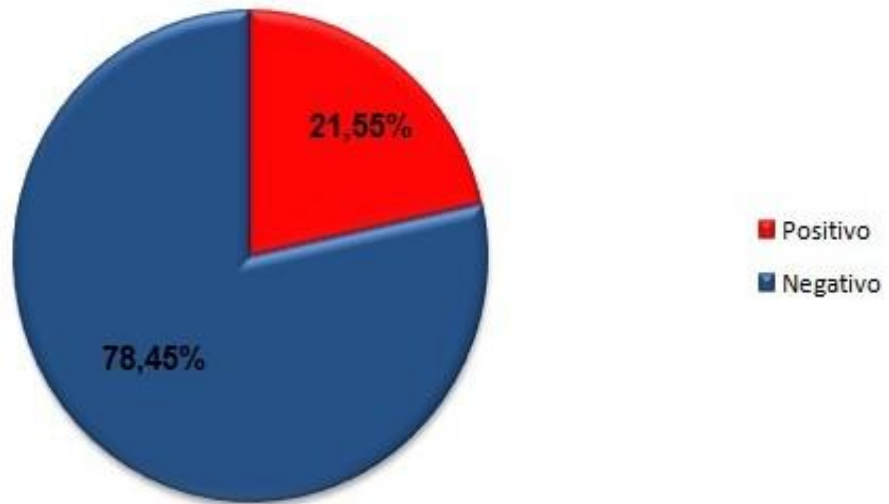
seguinto o mesmo protocolo da técnica anterior. Dessa forma, junto com os controles positivo e negativo, aplicados ao gel, foi testada a eficiência da PCR e eliminada a possibilidade de haver contaminação nas amostras (Figura 8).

Figura 8 - Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Contém amostras que foram refeitas devido à baixa intensidade das bandas no primeiro ensaio: **(1 e 8)** Marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). **(2 e 9)** Controle positivo. **(3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13)** Amostras confirmadas como positivas. **(7 e 14)** Controle negativo.



Esse procedimento apresentou reações com resultados constantes e reprodutíveis. A amostra coletada de 515 pacientes voluntárias foi processada de acordo com o protocolo descrito anteriormente. Dentro desse grupo foram identificadas 111 (21,55%) como positivas para a presença do DNA do HPV. As pacientes restantes não demonstraram nenhum indício da presença de material genético viral (Figura 9). Os casos positivos foram notificados e separados do resto da amostra, foi então realizada a repetição da técnica de PCR, sendo alcançada a quantidade ideal de *amplicons* para a utilização nas etapas posteriores.

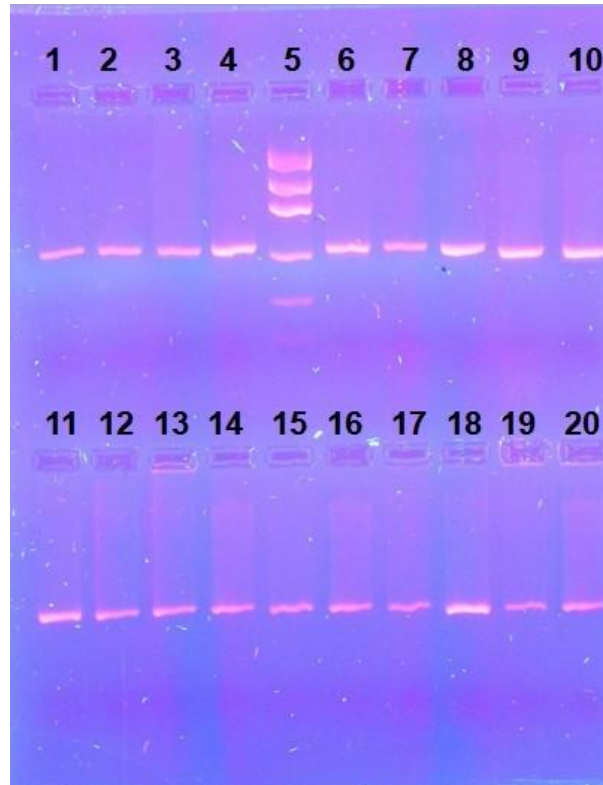
Figura 9 - Proporções da distribuição dos casos positivos e negativos dentro da amostra estudada.



## 5.2 Ensaio de Sequenciamento do DNA

Após a purificação as amostras foram comparadas por intensidade com os fragmentos do marcador de peso molecular de concentrações já determinadas. Cada fragmento do marcador utilizado *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, CA, USA), possui uma intensidade diferente e as seguintes concentrações: 100pb (10ng), 200pb (20ng), 400pb (40ng), 800pb (80ng), 1200pb (120ng) e 2000pb (200ng), permitindo dessa forma o ajuste da quantidade na amostra através de diluições quando necessário (Figura 10).

Figura 10 - Ensaio da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% para a diluição e padronização das concentrações utilizadas no sequenciamento: **(5)** *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, CA, USA). **(1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)** DNA viral purificado.



Seguindo a estratégia de genotipagem proposta, após a construção da reação de sequenciamento utilizando o conjunto de iniciadores MY09 e sua purificação, foram iniciados os testes de sequenciamento do DNA viral. As análises genéticas resultaram na identificação de cadeias nucleotídicas que seriam aceitas para continuação do estudo ou que necessitariam de uma otimização. Essa separação foi obtida através da visualização de eletroferogramas e pelo nível de definição dos picos determinado pelo software de análise, seguindo um padrão de qualidade.

Depois da reprodutibilidade alcançada na fase de testes, as análises foram realizadas em cima dos 111 casos positivos, onde a leitura das sequencias se tornou mais minuciosa devido às regras do programa. A esses eletroferogramas foram dados um Valor de Qualidade (QV) que poderiam variar de 0 a 60. Para os picos serem considerados de boa qualidade é preciso que o QV se apresentasse maior do que 20, sendo representado pelas barras superiores em cor azul. Quando

não ocorria dessa forma, os picos e suas respectivas cores eram analisados para a confirmação do nucleotídeo sequenciado. As figuras 11 e 12 demonstram os eletroferogramas obtidos na fase de teste e para o estudo da cadeia de nucleotídeos.

Figura 11 - Eletroferogramas analisados pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a qualidade das cadeias nucleotídicas. **A)** Sequencia de boa qualidade. **B)** Sequencia de baixa qualidade.

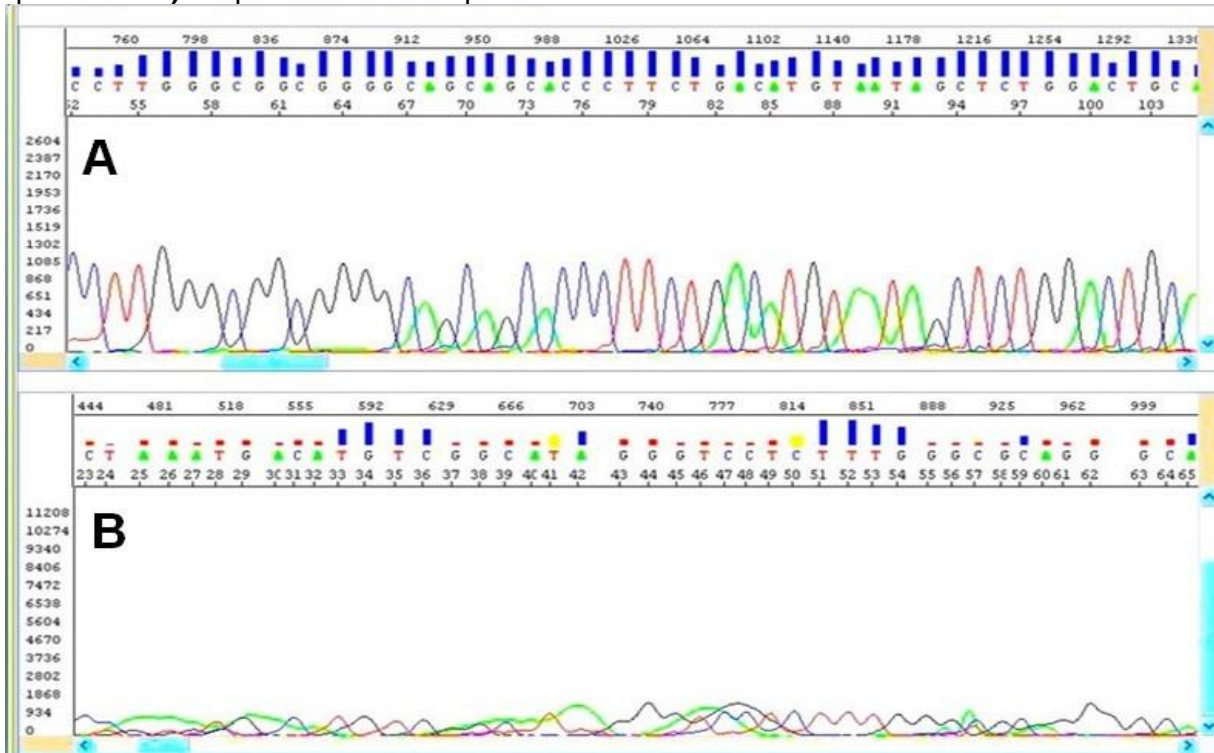


Figura 12 - Eletroferograma analisado pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a análise do pico que apresentou um QV < 20 para a confirmação do nucleotídeo.

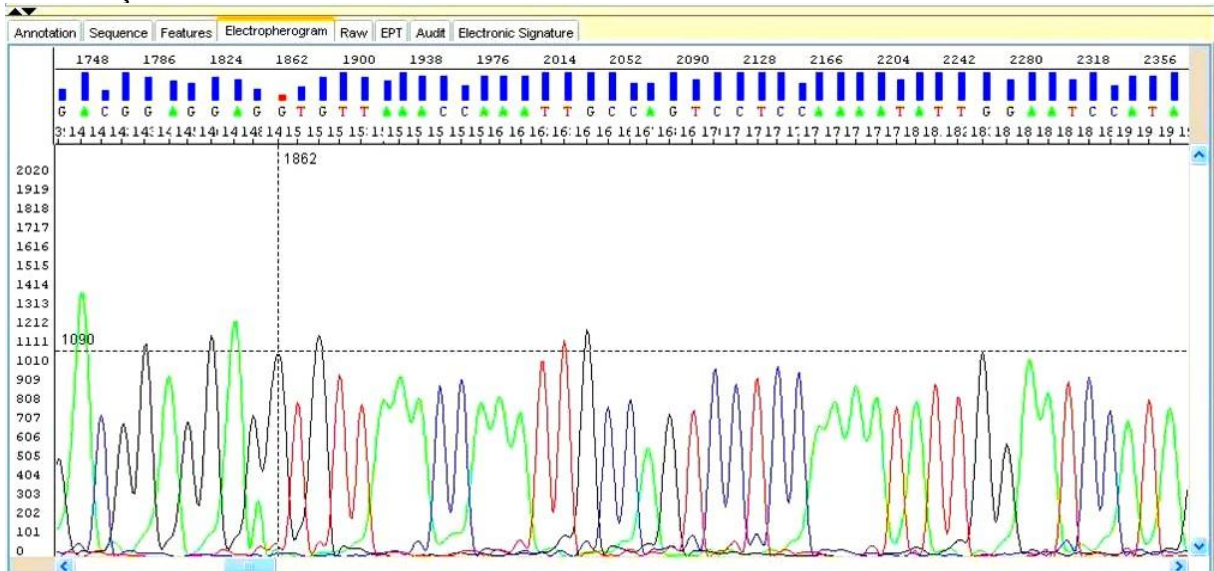






Figura 14 - Eletroferograma analisado pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems) demonstrando a presença de picos sobrepostos na cadeia de nucleotídeos sequenciada.

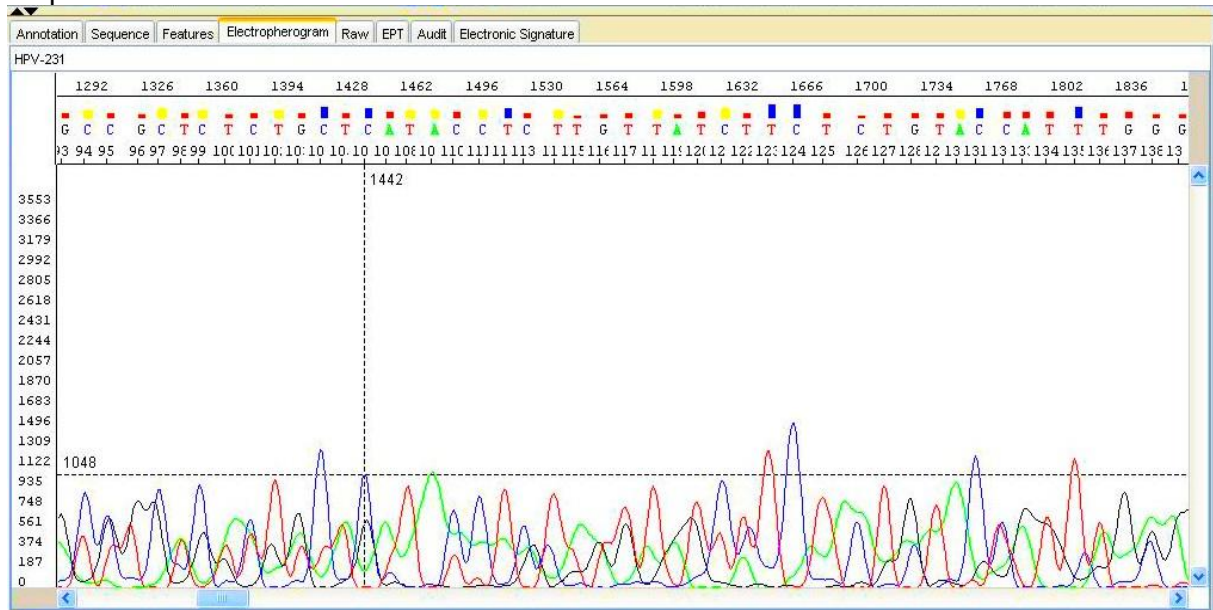
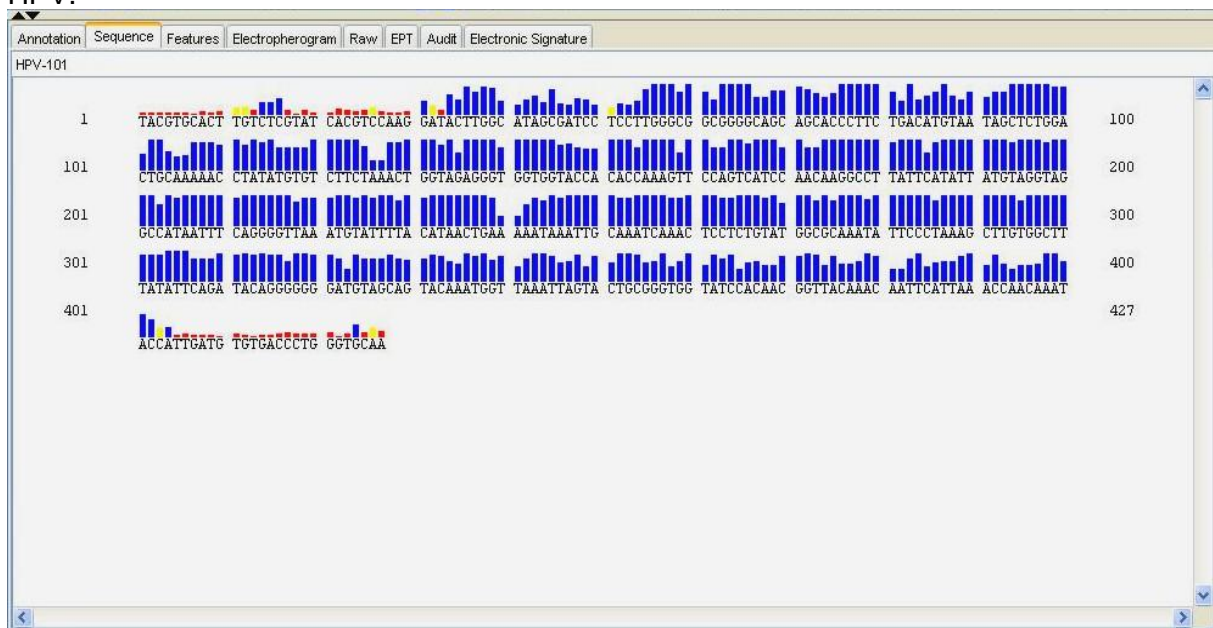


Figura 15 - Organização de uma sequência realizada pelo software Sequencing Analysis v.5.2.0 (Applied Biosystems). Procedimento realizado antes da identificação dos tipos de HPV.

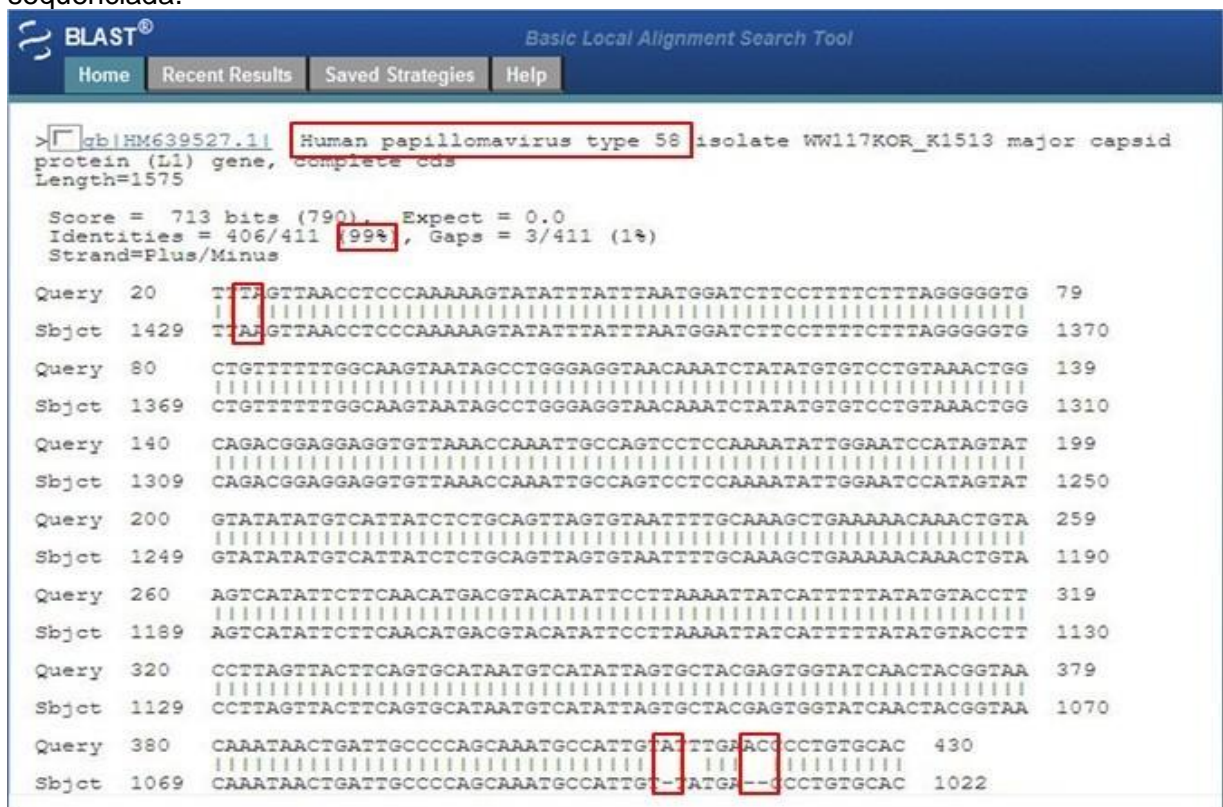


### 5.3 Tipagem Genética do Papilomavírus Humano por Similaridade

As sequências foram aplicadas no NCBI para o alinhamento utilizando a ferramenta online *BLAST*. As regiões do gene  $L_1$  foram pareadas com as

sequencias já identificadas presentes no banco de genomas do *site*. Foram identificados, dessa forma, os diversos tipos de HPV encontrados na amostra. Todas as sequencias copiadas apresentaram o nível mínimo de similaridade variando de 98 a 100%, confirmando a identificação do tipo viral (Figura 16).

Figura 16 - Alinhamento de uma sequencia obtida (*Query*) com uma região já conhecida do banco de genomas online (*Sbjct*) utilizando a ferramenta *BLAST*. As linhas vermelhas indicam o pareamento com o genoma do HPV-58 com um nível de similaridade de 99%, sendo destacadas também as regiões diferentes identificando assim o tipo viral da cadeia sequenciada.



Para a complementação dos resultados, as mesmas sequencias foram depositadas no software pDRAW32 (AcaClone Software) para a obtenção do padrão de restrição *in silico*. Foram aplicadas 4 enzimas: *RsaI*, *DdeI*, *PstI* e *HaeIII*. Com o mapa de corte individual de cada tipo viral, foi possível compará-los com o algoritmo de genotipagem original presente na literatura, confirmando a identificação dos tipos pelo alinhamento realizado no NCBI.

Através do programa foi possível criar um gráfico das sequencias com o padrão de restrição e até mesmo simular uma eletroforese em gel sob as mesmas condições de bancada. As Figuras 17 e 18 ilustram a aplicação do software.



Figura 17 - Gráfico de uma sequência obtido pelo software pDRAW32 (AcaClone Software) indicando os sítios de restrição das enzimas utilizadas.

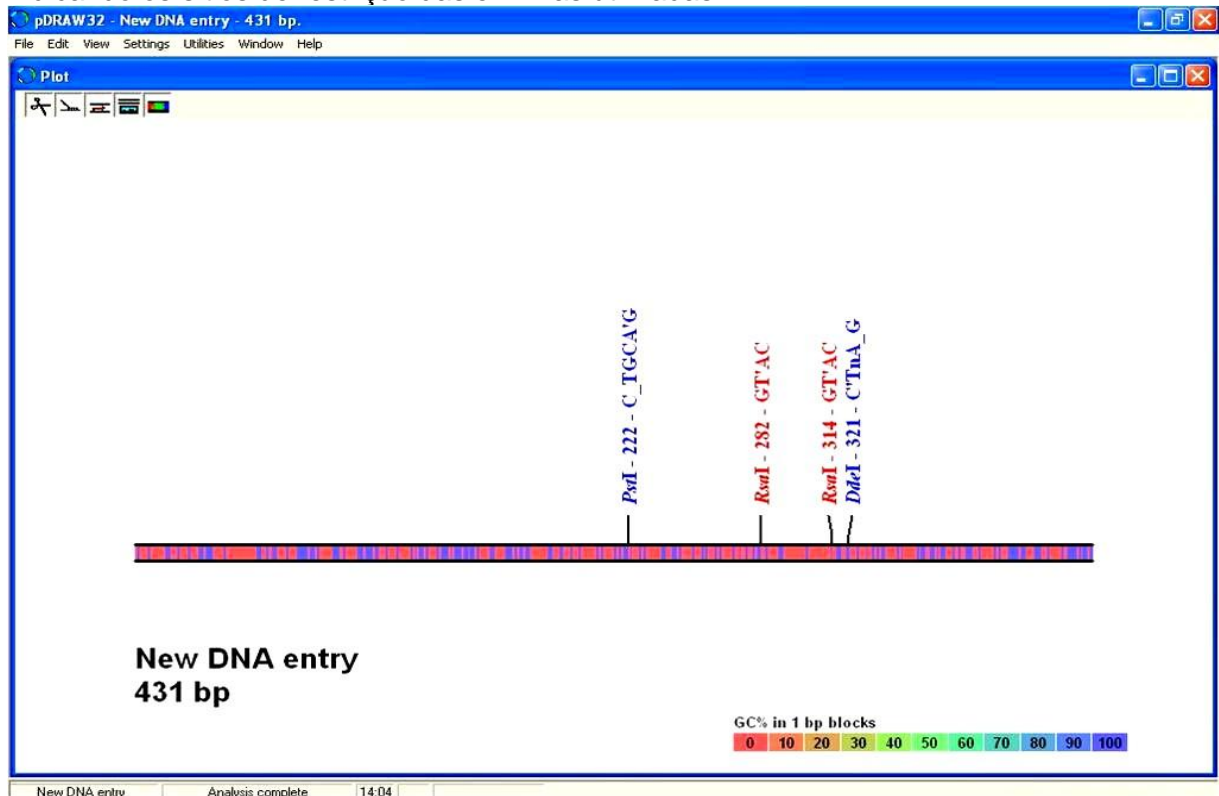
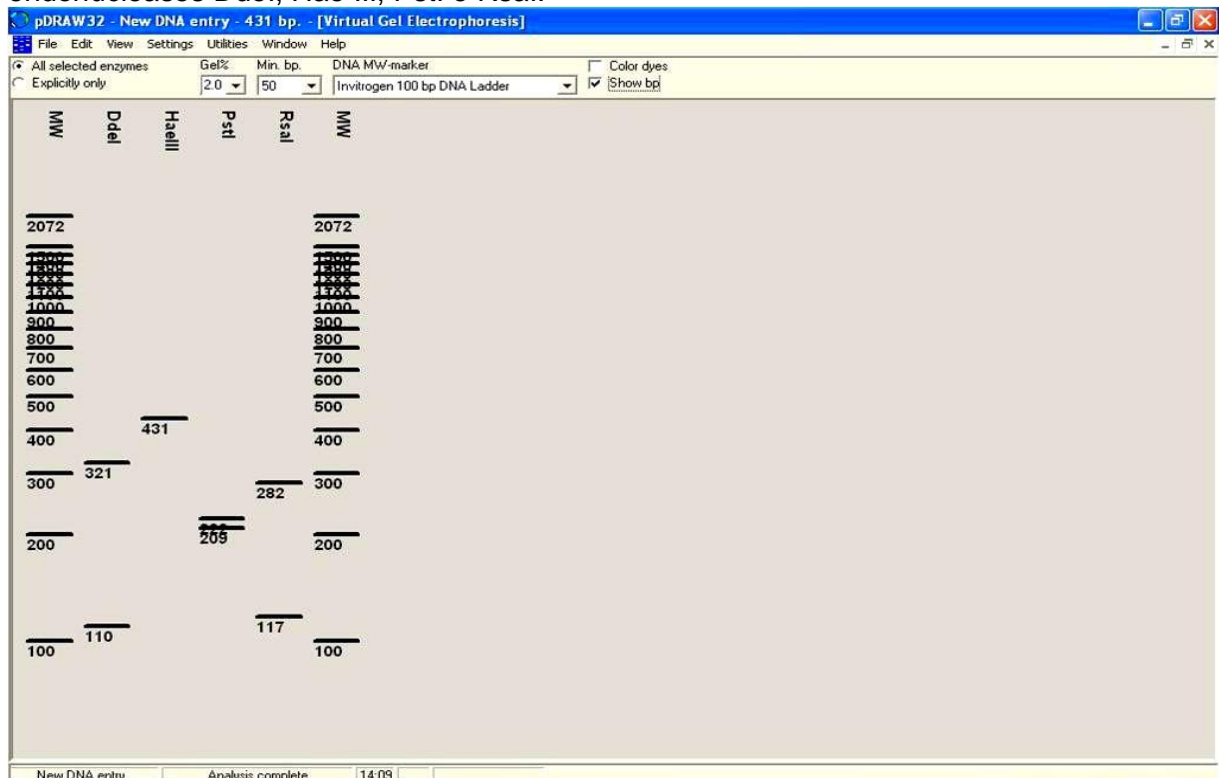


Figura 18 - Simulação de uma eletroforese em gel de agarose a 2% obtida pelo software pDRAW32 (AcaClone Software). Os dados *in silico* demonstram a aplicação do marcador de peso molecular de 100pb e o padrão dos fragmentos de DNA de um vírus utilizando as endonucleases DdeI, HaeIII, PstI e RsaI.



#### 5.4 Distribuição dos Genótipos

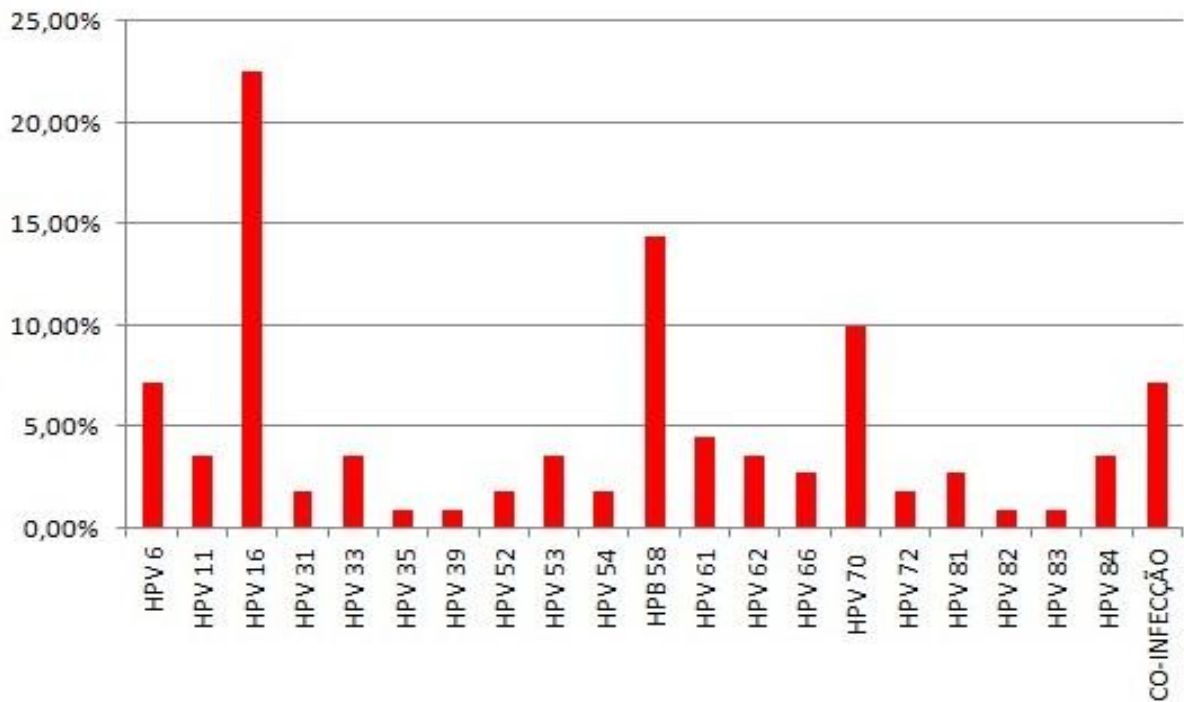
Foram identificados os genótipos de quase todos os casos positivos, assim como a presença de co-infecção. A seguir, a Tabela 6 mostra a variedade dos tipos de HPV encontrados na amostra de mulheres voluntárias à pesquisa.

Tabela 6 - Distribuição dos tipos virais identificados.

<b>Tipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>HPV-6</b>	8	7,21
<b>HPV-11</b>	4	3,60
<b>HPV-16</b>	25	22,52
<b>HPV-31</b>	2	1,80
<b>HPV-33</b>	4	3,60
<b>HPV-35</b>	1	0,90
<b>HPV-39</b>	1	0,90
<b>HPV-52</b>	2	1,80
<b>HPV-53</b>	4	3,60
<b>HPV-54</b>	2	1,80
<b>HPV-58</b>	16	14,41
<b>HPV-61</b>	5	4,50
<b>HPV-62</b>	4	3,60
<b>HPV-66</b>	3	2,70
<b>HPV-70</b>	11	9,91
<b>HPV-72</b>	2	1,80
<b>HPV-81</b>	3	2,70
<b>HPV-82</b>	1	0,90
<b>HPV-83</b>	1	0,90
<b>HPV-84</b>	4	3,60
<b>CO-INFECÇÃO</b>	8	7,21

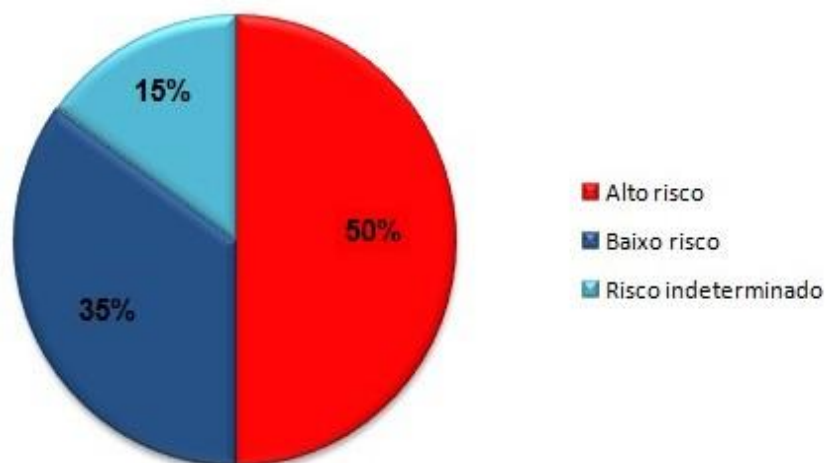
O HPV-16 e o HPV-58 foram os que apresentaram maior incidência dentro da amostra, seguidos pelo HPV-70, HPV-6 e os indivíduos que apresentaram um quadro de co-infecção (Figura 19).

Figura 19 - Gráfico demonstrando a distribuição dos genótipos encontrados na amostra analisada.



Dos 20 tipos diferentes de HPV rastreados na amostra, 10 (50%) são considerados de alto risco oncogênico e 7 (35%) classificados como de baixo risco. A Figura 20 mostra a distribuição dos genótipos encontrados de acordo com o potencial carcinogênico descrito na literatura.

Figura 20 - Proporções dos genótipos de alto e baixo risco oncogênico e de risco indeterminado rastreados entre os 20 tipos identificados.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Rastreamento Molecular do Papilomavírus Humano

A principal característica do presente estudo seria a utilização de critérios mais rigorosos de diagnósticos tornando os dados mais concretos em relação à infecção viral estudada. A consciência partiu da análise de trabalhos atuais que destacaram o uso de técnicas avançadas de rastreamento molecular.

A metodologia de coleta e armazenamento da amostra utilizando um Kit específico para HPV (Digene Corporation, Gaithersburg, Md.) se mostrou eficiente pela alta reprodutibilidade alcançada na extração do DNA. Por sua vez, o procedimento de extração orgânica (Fenol/Clorofórmio) descrito por Butler (2010) foi conveniente para a aplicação das técnicas posteriores.

Entende-se que o diagnóstico de lesões causadas pelo HPV seja tão importante quanto o diagnóstico do DNA viral. Entretanto, a presença de infecção subclínica leva a um problema no rastreamento da doença. Por um lado, sabe-se que a maioria das lesões intraepiteliais de baixo grau regridem espontaneamente (SOLOMON et al., 2001), e por outro, a presença e persistência do DNA de um HPV de alto risco aumenta em 100 vezes a chance do aparecimento do câncer cervical em mulheres livres da infecção (BOSCH et al., 2001). Pela análise dos procedimentos realizados e dos resultados obtidos, se tornou notável a busca de técnicas para acurácia diagnóstica.

As técnicas moleculares podem identificar os diversos tipos de HPV, separando-os nos grupos de baixo e alto risco oncogênico ou no grupo de risco indeterminado. Essas técnicas são aplicadas em células colhidas durante os procedimentos ginecológicos de rotina, facilitando a obtenção de amostras específicas que auxiliam no rastreamento do DNA-HPV. Pela alta sensibilidade e especificidade, esses métodos estão sendo bastante utilizados para a identificação do HPV, principalmente para os tipos de alto risco, responsáveis pelo desenvolvimento do câncer cervical (CARVALHO, 2009). Neste estudo foi realizado o diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a genotipagem através do sequenciamento do DNA associado ao alinhamento por similaridade.

## 6.2 Análise de Sequenciamento do Papilomavírus Humano

De acordo com os resultados alcançados antes da eletroforese capilar, as metodologias de purificação e de eletroforese em gel (BARBOSA, 2006) aplicadas na adequação das quantidades e concentração do DNA se apresentaram suficientes na construção da reação de sequenciamento, alcançando a obtenção das cadeias nucleotídicas dos diferentes tipos de HPV.

A determinação das sequências de base do gene  $L_1$  é fundamental para a identificação do tipo viral. Entretanto o sequenciamento desse gene completo e nos dois sentidos da cadeia de DNA se tornam inviáveis financeiramente para a maioria dos laboratórios especializados (LEE et al., 2009). Uma abordagem prática aplicada no trabalho foi determinar a sequência de uma região hipervariável do gene  $L_1$  contendo 450pb, sendo possível a identificação do HPV seguindo essa metodologia.

As infecções múltiplas são um fenômeno comum em mulheres infectadas pelo papilomavírus, isso pode ser explicado devido a uma maior exposição às relações sexuais desprotegidas ou a uma condição imunológica desfavorecida. Na metodologia realizada a presença de eletroferogramas com picos sobrepostos foi encarada como co-infecção contendo mais de um tipo de HPV. Isso acaba inviabilizando a genotipagem da amostra por sequenciamento (CARVALHO, 2009). Alguns estudiosos relatam uma baixa frequência de infecções múltiplas encontradas em outros trabalhos devido ao fato de que a PCR com os iniciadores MY09 e MY11, em amostras contendo múltiplos genótipos, pode amplificar preferencialmente alguns tipos virais e subestimar a presença de infecções múltiplas (JACOBS et al, 1999; KOSEL et al, 2003; VERNON et al, 2000).

Devido ao maior espectro de detecção, a PCR associada ao sequenciamento identificou o tipo viral em quase todos os casos positivos da amostra (21,55%, 111/515), além de ter rastreado 20 tipos diferentes de HPV. No entanto, apresentou a desvantagem de não identificar os tipos nos casos de co-infecção, onde as sequências genômicas dos vírus se apresentaram sobrepostas (7,21% dos casos positivos), impedindo a distinção dos tipos presentes, o que é relatado, também, por outros autores (CHOI et al, 2005; SERRANO et al, 2003).

### 6.3 Ensaio *in silico* e Genotipagem do Papilomavírus Humano

Após as sequências obtidas serem copiadas do programa, foram aplicadas no NCBI para o alinhamento com a ferramenta online *BLAST*. As cadeias de entradas foram pareadas com as depositadas no banco de genomas, identificando por similaridade os diversos tipos encontrados na amostra.

Complementando os dados obtidos, as sequências ainda foram aplicadas ao software pDRAW32 (AcaClone Software), para a criação de um padrão de restrição digital. Esse mapa de restrição foi comparado com um algoritmo de genotipagem original presente na literatura (NOBRE et al., 2008), onde é relatado um desenho de corte individual para cada tipo de HPV, permitindo a identificação.

Cerca de 95% dos cânceres de colo do útero estão associados aos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 (MUÑOZ et al., 2003). Estudos de meta-análise que observaram a distribuição dos tipos de HPV em amostras de mulheres revelaram que os cinco tipos mais prevalentes em todo o mundo são 16, 61, 58, 53 e 83 (CLIFFORD et al., 2006). De uma forma geral, estes achados são compatíveis com os tipos encontrados na amostra deste trabalho. A variabilidade dos tipos de HPV em outros estudos, em parte, pode ser devido ao fato de que quando se utilizam métodos de genotipagem distintos podem-se produzir resultados diferentes de acordo com a sensibilidade e a especificidade das técnicas empregadas, bem como o espectro de detecção dos diferentes tipos. Além disso, a prevalência dos tipos de HPV associados ao câncer cervical apresenta variações geográficas.

Outros trabalhos extensos têm demonstrado a presença do HPV-16 como o mais incidente na maioria dos países estudados. Já o HPV-18 possui maior prevalência na Argélia e Indonésia. O maior número de tipos de alto risco se encontra na África e América Latina. No Brasil, o HPV-16 é o mais prevalente, entretanto, existem variações em relação aos outros tipos encontrados (ROSENBLATT et al., 2005).

O grupo de alto risco foi o que obteve maior incidência na amostra analisada. Os tipos 16 e 58 foram os que mais apareceram como causa de infecção na presente metodologia. O HPV-16, considerado de alto risco oncogênico e o mais associado ao câncer de colo do útero, esteve presente em 22,52% dos casos positivos encontrados, corroborando com dados de outros estudos (ROSENBLATT et al., 2005; ZAMORA et al., 2009; LEE et al., 2009; CARVALHO, 2009; SATRA et

al., 2009). Em segundo lugar, o HPV-58 representou 14,41% dos casos genotipados, esse tipo também está fortemente associado ao câncer cervical, não possuindo a prevenção por vacinas, confirmando os dados expostos por Zamora *et al.* (2009). O HPV-70 (9,91%) e o HPV-6 (7,21%), também rastreados com frequência neste estudo, são considerados de baixo risco oncogênico e estão mais relacionados com o aparecimento de lesões clínicas como condilomas genitais (INSINGA *et al.*, 2009).

A compatibilidade dos principais tipos de HPV detectados neste estudo (16, 58, 70, 6, etc.) com os achados de outros trabalhos é um reflexo da alta disseminação desse vírus por meio de comportamentos promíscuos e/ou a falta de cuidados durante a atividade sexual, sendo evidente a importância de um rastreamento precoce evitando o agravamento da doença.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A prevenção de uma doença como o câncer cervical é considerada uma prioridade pela Organização Mundial da Saúde. O maior fator de risco para o desenvolvimento desse agravante é a infecção causada pelo HPV, sendo responsável pelo desencadeamento de todos os casos de câncer de colo do útero.
- Atualmente, a incidência, que já é alta, está aumentando vertiginosamente. Devido a esse fator a comunidade científica tem demonstrado um real interesse em desenvolver métodos padronizados de diagnóstico e tratamento para o HPV.
- Os resultados desse estudo mostraram a necessidade da aplicação de uma metodologia de diagnóstico viral mais sensível e específica. A utilização de técnicas moleculares que visam o rastreamento do DNA do HPV facilitaria a comparação com outros estudos, fornecendo dados mais concretos para a epidemiologia e para correlações com as lesões desencadeadas por esse microorganismo.
- O trabalho focou principalmente na utilização de um método sensível e específico para o rastreamento do DNA viral em uma amostra de mulheres do estado de Alagoas. Os resultados demonstraram que a metodologia empregada não interferiu nos valores encontrados, tornando os resultados reprodutíveis. Todos os indivíduos analisados foram submetidos às mesmas condições durante a administração dos ensaios.
- O diagnóstico positivo por PCR na amostra estudada (21,55%) confirmou a suspeita da prevalência da infecção na população de Alagoas. O alto índice dos tipos de alto risco oncogênico como o HPV-16 (22,52%) e o HPV-58 (14,41%) corroboraram com dados de outros estudos, demonstrando a relevância dos métodos de rastreamento utilizados. Todavia, seria necessária a aplicação de técnicas mais específicas em casos de co-infecções.



- Provavelmente, os únicos métodos de profilaxia da infecção causada pelo HPV, além do uso de preservativos durante o ato sexual, sejam a monogamia mútua e a abstinência sexual, atitudes pessoais, sendo desaconselhável e autoritária a intervenção médica. Entretanto, com a detecção precoce do DNA do HPV, algumas medidas poderiam ser tomadas para reduzir os riscos de transmissão: limitação do número de parceiros, investigar e tratar os parceiros e evitar a atividade sexual durante o tratamento e acompanhamento da doença.
- A metodologia realizada neste estudo se mostrou pioneira no Estado de Alagoas, possibilitando um melhor acompanhamento das pacientes, contribuindo para o controle da infecção viral, diminuição da incidência de mortalidade causada pelo câncer cervical e padronização de técnicas moleculares no rastreamento do DNA-HPV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAROSI, A et al. Management of lower genital tract abnormalities in HIV patients. In INTERNATIONAL CONGRESS OF CERVICAL PATHOLOGY AND COLPOSCOPY, 11., 2002. Barcelona. **Resumos...** Barcelona: Medimond International Proceedings, 2002. P. 366, ref. 03-08.

AIDÉ, S et al. Neoplasia Intraepitelial Cervical. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 21, p. 166-170, 2009.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Performing DNA Sequencing Reactions. Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide**, 1. ed. Cleveland, Ohio, 2000. 68p.

BAIROS DE MACEIÓ. **Mapas**, Maceió, 10 ago. 2011. Disponível em: <<http://bairrosdemaceio.net>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

BARBOSA, A. B.G. **Determinação do polimorfismo das sequencias de DNA mitocondrial humano na população de Alagoas, Brasil**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BARRET, T. J.; SILBAR, J. D.; Mc GINLEY, J. P. Genital warts a venereal disease. **The Journal of the American Medical Association**, v. 154, p. 333-334, 1954.

BOSCH, F. X et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p. 796-802, 2001.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ, 2008. 96 p.

BRASIL. Organização Mundial da Saúde. **HPV**. São Paulo, SP, 2008. 16 p.

BRASIL, Sociedade Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. **Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo, SP, 2002. 19 p.

BROW, D. R et al. Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata from immunosuppressed patients. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 101, p. 992-998, 1994.

BUNTING, H. Close-packed array of vírus-like particle within cells of a human skin papilloma. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 84, p. 327-332, 1953.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. 2 ed. Gaithersburg: Elsevier, 2010.

CARVALHO, N. O. **Comparação dos métodos de tipagem do HPV por meio de amplificação por PCR usando-se iniciadores tipo-específicos e por sequenciamento direto do produto amplificado.** 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, T. M. P. P. G et al. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, p. 167-171, 2009.

CHOI, Y. D et al. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA Chip and sequencing. **Gynecologic Oncology**, v. 98, p. 369-375, 2005.

CLIFFORD, G. M.; GONÇALVES, M. A. G.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p. 2337-2344, 2006.

COLLINS, F. S. **A linguagem da vida: o DNA e a revolução na saúde.** 1 ed. São Paulo: Editora Gente, 2010.

CORRÊA, G. J. **Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor do colo uterino.** 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

DAVIDSON, F. Yasts and circumcision in the male. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 53, p. 121-129, 1977.

DERMIS. **Infecções por Papilomavírus**, Rio de Janeiro, 06 maio 2011. Disponível em: <<http://lookfordiagnosis.com>>. Acesso em: 06 maio 2011.

DÔRES, G. B et al. Aspectos epidemiológicos da infecção cérvico-vaginal pelo Papilomavírus Humano. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 101, p. 369-375, 1991.

DUNN, A. E. G.; OGILVIE, M. M. Intranuclear virus particles in human genital warts tissue: observations on the ultrastructure of the epidermal layer. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 22, p. 282-295, 1968.

FERENCZY, A. Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, p. 1331-1339, 1995.

GONÇALVES, M.A.G et al. HPV type infection in different anogenital sites among HIV-positive Brazilian women. **Infectious Agents and Câncer**, v. 3, p. 5-11, 2008.

GRAVITT, P. E et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 357-361, 2000.

INSINGA, R. P.; DASBACH, E. J.; ELBASHA, E.H. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. **BMA Infectious Diseases**, v. 119, p. 01-26, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas**, Rio de Janeiro, 10 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

JACOBS, M. V et al. Reliable high risk HPV DNA testing by polymerase chain reaction: an intermethod and intramethod comparison. **Journal of Clinical Pathology**, v. 52, p. 498-503, 1999.

JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B.L.; LAMBERT, P. F. Human Papillomavirus (HPV). **Journal of Virology**, v. 69, p. 2989-2997, 1995.

KANESHIMA, E. N et al. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 731-737, 2001.

KOLPOSKOPIA. **HPV**, Rio de Janeiro, 12 set. 2011. Disponível em: <<http://kolposkopia.pl>>. Acesso em: 12 set. 2011.

KOSEL, S et al. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting – improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridisation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, p. 787-791, 2003.

KOSS, L. G.; DURFEE, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix, citologic and pathologic study of koilocytotic atypia. **The New York Academy of Sciences**, v. 63, p. 1245-1261, 1956.

LEE, S.H et al. Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. **BMC Clinical Pathology**, v. 9, p. 3-13, 2009.

LOWY, D. R.; FRAZER, I. H. Prophylatic human papillomavirus vaccines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 31, p. 111-116, 2003.

MEISELS, A.; FORTIN, R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I. Cytologic patterns. **Acta Cytologica**, v. 20, p. 505-509, 1976.

MUÑOZ, N et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Câncer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic Local Alignment Search Tool**. USA, 02 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 02 jan. 2011.

NOBRE, R.J.; DE ALMEIDA, L.P.; MARTINS, T.C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, p. 13-21, 2008.

ORIEL, J. D.; ALMEIDA, J. D. Demonstration of vírus particles in human genital warts. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 47, p. 37-42, 1970.

OZBUN, M. A. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. **Journal of Virology**, v. 76, p. 11291-11300, 2002.

PAPANICOLAOU, G. N. The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. **The American Journal of Anatomy**, v. 52, p. 519-611, 1933.

PASSOS, M. R. L. **DST**. 4.ed. São Paulo, Cultura Médica, 1995.

PINOTTI, J. A.; RICCI, M. D. **Panorama do HPV no Brasil e no Mercosul**. 1 ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2005.

PRO-CÉLULA. **Atlas digital de citopatologia e histopatologia do colo uterino**, Rio de Janeiro, 20 dez. 2011. Disponível em: <<http://pro-celula.com.br>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

QUINT, W.G.V et al. Results of the First World Health Organization International Collaborative Study of Detection of Human Papillomavirus DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 571-579, 2006.

ROSENBLATT, C et al. **HPV na Prática Clínica**. 1 ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2005.

ROUS, P.; BEARD, J. W. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). **The Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 523-548, 1935.

SALVIA, P. N. D. **Correlação entre critérios morfológicos, citológicos e histológicos e presença do DNA do Papilomavírus Humano em biópsias cervicais uterinas detectado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. 2004. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SATRA, M et al. Sequence-based genotyping HPV L1 DNA and RNA transcripts in clinical specimens. **Pathology – Research and Practice**, v. 205, p. 01-07, 2009.

SCHNEIDER, A et al. Distribution of human papillomavirus 16 genome in cervical neoplasia by molecular *in situ* hybridization of tissue sections. **International Journal of Cancer**, v. 39, p. 717-721, 1987.

SEO, Y. S et al. Bovine papillomavirus (BPV) encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 2865-2869, 1993.

SHOELL, W. M.; JANICEK, M. F.; MIRHASHEMI, R. Epidemiology and biology of cervical cancer. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 16, p. 203-211, 1999.

SERRANO, M. L et al. Tipificação de vírus Del papiloma humano mediante secuencia directa em mujeres com citologia normal. **Revista Colombiana de Cancerologia**, v. 7, p. 18-24, 2003.

SILVA, E. D. C et al. Papilomavírus Humano. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, p. 137-142, 2004.

SÖDERLUND-STRAND, A.; DILLNER, J.; CARLSON, J. High-throughput genotyping of oncogenic human papilloma viruses with MALDI-TOF mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 86-92, 2008.

SÖDERLUND-STRAND, A et al. Comparison between the hybrid capture II test and a PCR-based human papillomavirus detection method for diagnosis and posttreatment follow-up of cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3260-3266, 2005.

SOFTS E RECEITAS. **HPV e o Papilomavírus**, Rio de janeiro, 08 mai. 2011. Disponível em: <<http://softreceitas.blogspot.com/2011/01/hpv-e-os-papilomavirus-galdinosagua.html>>. Acesso em: 08 mai. 2011.

SOLOMON, D.; SCHIFFIMAN, M.; TARONE, R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. **Journal of the National Cancer Institute**, n. 93, p. 293-299, 2001.

TEOKHAROV, B. A. Non-gonococcal infections of the female genitalia. **British Journal of Venereal Diseases**, v. 45, p. 334, 1969.

THOMAS, K. K et al. Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 1097-1102, 2000.

VERNON, S. D.; UNGER, E. R.; WILLIAMS, D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 651-655, 2000.

VERTERAMO, R.; PIERANGELI, A.; MANCINI, E.; *et al.* Human Papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. **BMC Infectious Diseases**, v. 119, p. 09-16, 2009.

WALBOOMERS, J. M et al. Human Papilomavírus is a necessary cause of invasive cervical câncer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WANDERLEI-SILVA, D et al. High Quality DNA from Human Papillomavirus (HPV) for PCR/RFLPs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 37-40, 2005.

ZAMORA, P. C et al. Genotype distribution of human papillomavirus (HPV) and co-infections in cervical cytologic specimens from two outpatient gynecological clinics in a region of southeast Spain. **BMC Infectious Diseases**, v. 124, p. 10, 2009.

ZHOU, J et al. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. **Virology**, v. 214, p. 167-176, 1995.

## **APÊNDICES**



**APÊNDICE A** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado às pacientes participantes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

*“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.”* (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu, ....., tendo sido convidado a participar como voluntário do estudo Epidemiologia Molecular do Papilomavírus Humano Em Uma Amostra de Mulheres do Estado de Alagoas, recebi do Sr. Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) – Laboratório de Genética Forense e Identificação Humana da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina ao: Levantamento Epidemiológico dos principais tipos de Papilomavírus Humano (HPV) que acometem uma amostra de mulheres do Estado de Alagoas assim como as diversas co-infecções relacionadas.
- Que a importância deste estudo é: Contribuir com dados estatísticos mais concretos relacionados às infecções e cânceres causados pelo Papilomavírus Humano no Brasil.
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: Determinar através de PCR-RFLP a frequência do Papilomavírus Humano numa amostra de mulheres da população do Estado de Alagoas e quais as co-infecções presentes, com base na amplificação do gene L1.
- Que esse estudo começará em 08/02/2010 e terminará em 08/02/2012.
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Serão analisadas amostras de 500 mulheres do Estado de Alagoas obtidas do Centro de Colposcopia e Citologia Dra. Anália lobo e do Posto de Atendimento Médico Salgadinho. A amostra será obtida através da retirada de material endocervical seguindo as normas técnicas e éticas aplicáveis aos procedimentos de coleta. O DNA será extraído pelo método orgânico e amplificado por PCR, após esse procedimento será aplicada a técnica de RFLP com posterior análise em gel de poliacrilamida a 6%. Os resultados serão comparados com análises *in silico* realizadas anteriormente pelos softwares GeneRunner v.3.05 e pDRAW32.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Coleta com escova endocervical.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: Realização da técnica de PCR com posterior Hibridização e análise através de Sequenciamento Genético.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: Nenhum.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: Nenhum
- Que, se eu vier a sofrer algum dos danos previstos em virtude de minha participação na pesquisa, eu deverei ser indenizado das seguintes formas: Por não existir danos, não há formas de indenização.

- Que deverei contar com a seguinte assistência: Nenhuma, sendo responsável - Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: Estar contribuindo para dados mais concretos em relação à infecção e epidemiologia do Papilomavírus Humano no Estado de Alagoas através desse estudo.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: Será realizada a coleta de amostras endocervicais seguindo padrões e normas éticas aplicadas à coleta. Portanto não há risco de nenhuma forma conhecida de contaminação. As coletas serão realizadas pelos Médicos responsáveis dos locais de coleta e colaboradores do projeto.
- Que, sempre que necessário, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, as mulheres estudadas serão informadas dos resultados da pesquisa e junto com os pesquisadores estarão dispostas a discutir com as pessoas que constituíram a amostra da pesquisa os resultados obtidos de maneira clara e compreensível, criando a partir daí um dialogo fértil.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

**Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)**

Domicílio: (rua, praça, conjunto):

Bloco: /Nº: /Complemento:

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:

Ponto de referência:

**Contato de urgência: Sr(a).Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho**

Domicílio: (rua, praça, conjunto): Rua Dr. Ciridião Durval

Bloco: /Nº: /Complemento: 98

Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone: Farol / 57051-230, Maceió–AL, (82) 33365583 / 99598399.

Ponto de referência: Próximo a Praça Gonçalves Ledo

**Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa:**

Instituição: Prof. Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva

Endereço: Rua Sandoval Arroxelas  
 Bloco: /Nº: /Complemento: 522, aptº 603  
 Bairro: /CEP/Cidade: Ponta Verde / 57035-230/ Maceió  
 Telefones p/contato: 3336-6558

**ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS:**

**Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária**

**Telefone: 214-1053**

**(Informações obrigatórias)**

Maceió,

<p>(Assinatura ou impressão datiloscópica  d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal  - Rubricar as demais folhas)</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(eis)  pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>

**APÊNDICE B** – Questionário aplicado às pacientes participantes para a obtenção de informações relevantes.

## Questionário

Data coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Dr.(a)\_\_\_\_\_

Registro ou prontuário:\_\_\_\_\_ Código : \_\_\_\_\_

End.\_\_\_\_\_

Nome:\_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Gestante : Sim ( ) Não ( ) Paridade:\_\_\_\_\_

Método anticonceptivo: Sim ( ) Não ( ) Fumante : Sim ( ) Não ( )

História de DST: Sim ( ) Não ( ) Qual?\_\_\_\_\_

Nº de parceiros:\_\_\_\_\_ Idade da 1º relação:\_\_\_\_\_

História Clínica:

Assintomática ( )

Sintomática ( )

Corrimento persistente ( ) Ardor vaginal ( ) Colo friável ( )

Dor pélvica ( ) Sinusiorragia ( ) Infertilidade ( )

Outros: \_\_\_\_\_

Exame de Colposcopia: Normal ( ) Anormal ( )

Achados:

Exame de Citologia: