



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

Dissertação de Mestrado

***COMPARAÇÃO DE DIFERENTES CONJUNTOS DE PRIMERS PARA
DETECÇÃO DE HPV EM MULHERES HIV-POSITIVAS E HIV-
NEGATIVAS.***

FERNANDA CRISTINA DE LIMA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Vera Aparecida Saddi

Goiânia-GO

Março - 2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

***COMPARAÇÃO DE DIFERENTES CONJUNTOS DE PRIMERS
PARA DETECÇÃO DE HPV EM MULHERES HIV-POSITIVAS E
HIV-NEGATIVAS.***

FERNANDA CRISTINA DE LIMA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Goiânia-GO

Março - 2009

L732c Lima, Fernanda Cristina de.
Comparação de diferentes conjuntos de primers
para detecção de HPV em mulheres HIV-positivas e
HIV-negativas / Fernanda Cristina de Lima. – 2009.

100 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de
Goiás, 2009.

“Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi”.

1. HPV – HIV – PCR – primers – PGMY. 2. Câncer
cervical – HPV – mulheres – HIV-positivas – HIV-
negativas. 3. Papilomavírus humano. I. Título.

006.6:578.827(043.3)

CDU: 616-

578.5
618.14-006
618.146



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.ucg.br • prope@ucg.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2009 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

10 (Dez)

Vera Aparecida Saddi

Dr^a. Vera Aparecida Saddi / MGene - UCG
(presidente orientadora)

Renata de Bastos A. Soares

Dr^a. Renata de Bastos Ascenço Soares – MGene – UCG
(membro interno)

Fabiola Souza Fiaccadori

Dr^a. Fabíola Souza Fiaccadori - UFG
(membro externo)

Aos meus pais, por me permitirem
chegar até aqui.

Aos meus irmãos, pelo carinho

Para minha filha, pelos melhores
sorrisos e abraços do mundo.

Para Fred, pelo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

“A vocês, que estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que, de uma forma ou de outra, demonstrei total alegria... Agradecer pelo sorriso diário, agradecer de peito aberto, de alma explosiva... Hoje quero parar e simplesmente agradecer, porque vocês fazem parte da minha história!” (Autor desconhecido)

A Deus pela oportunidade da vida, pela força e persistência, pela renovação diária da fé, sem a qual não teria conseguido chegar até aqui.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, meu muito obrigada! Antecipo aqui, minhas desculpas àqueles que não forem citados por esquecimento.

Em especial, agradeço:

Minha filha Júlia por ter me mostrado que amor não tem limites. Por ter chegado a minha vida para trazer paz, luz e muita alegria. Filha, mesmo sendo tão pequenina, obrigada por compreender minha ausência, impaciência e correria. Isso é pra você e por você. Te amo, minha princesa loirinha!

Meus pais, Sérgio e Ângela, pessoas iluminadas, pela confiança depositada em mim. Pelo amor, compreensão, ajuda nas horas mais difíceis... Pelos momentos em família que me deram toda a base de vida que tenho hoje. Amo vocês!

Minha orientadora, Dra. Vera, pela amizade e confiança. Mais que uma orientadora, uma amiga. Obrigada pelas dicas, conversas e gargalhadas nos momentos mais difíceis!

Meus queridos irmãos Eduardo e Júnior, pelo carinho, ajuda e amor. Júnior, olha só que maravilha, agora você vai poder voltar a usar o computador!

Meus familiares queridos, que mesmo longe, nunca se esquecem de nós, em especial, Edna, vó Cida, vó Fina, todos os tios e primos...

Luciana Vaz, minha amiga, companheira de todas as horas! Pelas horas compartilhadas no laboratório, pelas conversas, pelas fofocas, pelas dicas de moda... Lu, sem sua amizade não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada de coração, você se tornou uma pessoa muito especial na minha vida.

Ao meu amor pra toda vida, Fred, por ter finalmente me encontrado! Te esperei por tanto tempo!!! Obrigada pela paciência, por aguentar o mau humor e a falta de tempo... Obrigada pelo apoio em todas as horas! Te amo, meu amor!

Aos amigos de todas as horas, Ângela Adamski, Carol, Alessandra, Hellen, Junelle, Leonardo, Lorena Cristina, Alessandra e Fabrício Rocha... Pelo carinho e ajuda em todos os momentos.

A dois grandes companheiros de jornada, Willana, minha priminha, e Diego. Sem a ajuda de vocês dois esse trabalho não teria saído! Muito obrigada mesmo!

Aos professores, funcionários e amigos da Universidade Católica de Goiás: Peixoto, Eduardo, Daniela, Mariana, Flávio, Marcus Vinícius, Renato e todos os alunos de iniciação científica da Prof.^a Vera.

Aos professores do Mestrado em Genética, meu muito obrigada! Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás, em especial, Dr. Luiz Artur Bataus, que me deu a primeira oportunidade como pesquisadora. Obrigada pela amizade e pela chance única!

A todos os colegas da PRIMEIRA turma do MGENE, em especial, Priscilla, Wilmar, Bráulio, Roberto e Antoniella. Obrigada por caminharmos juntos!

Aos amigos e colaboradores do projeto: Dra. Silvia Helena Rabelo-Santos, Dra. Rosane Alves Figueiredo, Dr. João Serafim C. Neto, Dr. Marcus Milki, e Dra. Megmar Carneiro e Laiza Alencar Santos. Obrigada pela ajuda e comprometimento.

Aos amigos do Centro de Apoio ao Doente com AIDS, Dr. Marcus Milki e Tocha, pela cooperação e parceria, sem os quais não teríamos meios de realizar esse projeto.

Obrigada, de coração, a todos vocês que participaram dessa fase tão importante em minha vida!

Para o desenvolvimento das atividades de mestrado, este estudo contou com o apoio indispensável das seguintes instituições: Departamento de Biologia da Universidade Católica de Goiás; Núcleo de Pesquisas Replicon; Centro de Apoio ao Doente com AIDS (CADA) e Laboratório Rômulo Rocha – UFG. O mestrado contou ainda com o auxílio de uma bolsa de estudos parcial da CAPES.

Sumário

	Página
I. Introdução	17
I.1. O Papilomavírus Humano	19
I.2. Patogênese da Infecção pelo HPV	22
I.3. Fatores de Risco para a Infecção pelo HPV	27
I.3.1. Lesões Cervicais Induzidas pela Infecção pelo HPV.	29
I.4. Métodos de Detecção do DNA do HPV	31
I.4.1. Testes de Captura Híbrida II (HC)	34
I.4.2. Testes Baseados em Amplificação por PCR	36
I.5. Primers Usados na Detecção do HPV por PCR Convencional	38
I.5.1. Primers Genéricos GP5/GP6	39
I.5.2. Primers Genéricos GP5+/GP6+	39
I.5.3. Primers Degenerados MY09/11	41
I.5.4. Primers Consensuais PGMY09/11	42
II. Justificativas	44
III. Objetivos	45
III.1. Objetivos Gerais	45
III.2. Objetivos Específicos	45
IV. Metodologia	46
IV.1. Seleção de Pacientes	46
IV.2. Detecção do Genoma do HPV nos Espécimes Endocervicais	46
Utilizando Ensaio de PCR	
IV.2.1. Desenho do Experimento	46
IV.2.2. Extração de DNA das Amostras Coletadas	47
IV.2.3. Análise da Qualidade do DNA Extraído por meio de	47
Amplificação de um segmento do gene GAPDH.	
IV.2.4. Detecção do Genoma Viral Utilizando os Primers Genéricos	49
GP5+/GP6+	
IV.2.5. Detecção do Genoma Viral Utilizando os Primers Degenerados	51
MY09/11.	
IV.2.6. Detecção do Genoma Viral Utilizando os Primers Consensuais	51

PGMY09/11	
IV.3. Análise Estatística dos Resultados Comparativos entre as Metodologias	53
V. Resultados	54
V.1 Grupo Amostral	54
V.2. Epidemiologia	55
V.3. Citologia Oncótica Cervical	56
V.4. Detecção do Genoma do HPV nas Amostras Cervicais Utilizando os Primers GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11	57
V.5. Comparação dos Resultados da Detecção do DNA do HPV Utilizando os Primers GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11 para o grupo das Pacientes HIV-Positivas e HIV-Negativas	59
V.6. Comparação dos Resultados da Detecção do DNA do HPV entre os dois Grupos de Pacientes	62
V.7. Comparação dos Primers GP5+/GP6+ e MY09/11; GP5+/GP6+ e PGMY09/11 e MY09/11 e PGMY09/11 para Detecção do HPV em Pacientes HIV-positivas.	63
V.8. Comparação dos Primers GP5+/GP6+ e MY09/11; GP5+/GP6+ e PGMY09/11 e MY09/11 e PGMY09/11 para Detecção do HPV em Pacientes HIV-negativas.	64
VI. Discussão	67
VII. Conclusões	78
VIII. Referências Bibliográficas	79
Anexos	96

Figuras

		Página
Figura 1	Mapa genômico do HPV16.	4
Figura 2	Integração do genoma do HPV e instabilidade cromossômica na patogênese do câncer invasivo.	7
Figura 3	Representação esquemática dos diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical.	8
Figura 4	Mecanismos moleculares da infecção por HPVs oncogênicos.	9
Figura 5	Esquema representativo da técnica de Captura Híbrida.	19
Figura 6	Esquema representativo do método de PCR.	21
Figura 7	Comparação dos produtos de PCR após eletroforese em gel utilizando os primers GP5/GP6 e GP5+/GP6+.	24
Figura 8	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR utilizando os primers GP5+/GP6+.	42
Figura 9	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR utilizando os primers MY09/11.	43
Figura 10	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR utilizando os primers PGMY09/11.	43

Tabelas

		Página
Tabela 1	Descrição dos reagentes e respectivas concentrações ([]) utilizados na amplificação de um segmento do gene GAPDH.	32
Tabela 2	Protocolo de ciclagem da amplificação de GAPDH.	33
Tabela 3	Sequências dos primers GP5/GP6 e sua versão estendida GP5+/GP6+.	33
Tabela 4	Reagentes utilizados nos três métodos de PCR analisados.	34
Tabela 5	Protocolos de Ciclagem utilizados para os três métodos de PCR presentes no estudo.	34
Tabela 6	Sequência de alinhamento dos primers MY09/11.	36
Tabela 7	Sequência dos primers PGMY09/11.	37
Tabela 8	Características sócio-demográficas e comportamentais das mulheres HIV-positivas e HIV-negativas estudadas.	39
Tabela 9	Comparação entre citologia e detecção de HPV nas pacientes HIV-positivas, com os três conjuntos de primers utilizados.	41
Tabela 10	Comparação entre citologia e detecção de HPV nas pacientes HIV-negativas, com os três conjuntos de primers utilizados.	41
Tabela 11	Frequência das categorias por metodologias: grupo de pacientes HIV-positivas.	44
Tabela 12	Frequência das categorias por metodologias: grupo de pacientes HIV-negativas.	45
Tabela 13	Tabela descritiva da detecção do DNA do HPV utilizando-se as três metodologias de PCR abordadas no estudo entre os dois grupos de pacientes.	46
Tabela 14	Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.	47
Tabela 15	Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.	48
Tabela 16	Concordância geral entre os primers MY09/11 e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.	48
Tabela 17	Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.	49
Tabela 18	Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.	50
Tabela 19	Concordância geral entre os primers MY09/11 e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.	50
Tabela 20	Estudos encontrados na literatura envolvendo a detecção do DNA do HPV por diferentes metodologias baseadas em PCR.	61

Anexos

		Página
Anexo 1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás (CEP-UCG).	96
Anexo 2	Termo de Consentimento Escrito.	97
Anexo 3	Ficha de características sócio-demográficas e comportamentais.	99
Anexo 4	Protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração pelo método de nitrato de prata.	100

Siglas, Símbolos e Abreviaturas

HPV	Human Papillomavirus
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
HSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
LSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JEC	Junção Escamo-colunar
DNA	Desoxirribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Kb	Kilo bases
ORF	Open Reading Frame
IARC	International Agency for Research in Cancer
pRb	Proteína do Retinoblastoma
FDA	Food and Drugs Administration
HC2	Hybrid Capture 2
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
ASC-US	Células escamosas de significado indeterminado
HAART	Highly active antiretroviral therapy
CADA	Centro de Apoio ao Doente com AIDS
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
PB	Pares de base
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase
K	Índice Kappa
Q	Teste Cochrane

RESUMO

O fato de que a infecção pelo HPV é fator causal no desenvolvimento do câncer cervical fornecem o requisito necessário para a inclusão dos testes de detecção de HPV na rotina ginecológica. A detecção do vírus permite a detecção precoce da infecção pelo HPV, possibilitando intervenções no desenvolvimento de lesões precursoras e dessa forma, diminuindo o risco de progressão para o câncer cervical. Diferenças existentes nas sequências de nucleotídeos que determinam as regiões precoces e tardias do genoma do HPV são responsáveis pela existência dos diversos tipos de HPVs conhecidos. Essas variações também são responsáveis pelo grau de transformação e potencial oncogênico do vírus. Assim, tais regiões podem ser exploradas para o desenvolvimento de testes moleculares tipo-específicos ou que envolvam o maior número possível de tipos de HPV. Existem dois grupos de métodos principais para a detecção de HPV: a hibridização direta (*Southern blot*, *dot blot*, e hibridização *in situ*) e a amplificação gênica (técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase – PCR). As metodologias baseadas em PCR, utilizando primers consensuais, permitem a detecção de um grande número de tipos de HPV simultaneamente. Os primers são desenvolvidos tendo como alvo regiões conservadas do genoma do HPV entre diferentes tipos virais. O objetivo deste estudo foi avaliar a infecção pelo HPV em dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas, comparando as três metodologias de PCR mais utilizadas na detecção do HPV atualmente, utilizando os conjuntos de primers GP5+/GP6+; MY09/11 e PGMY09/11. Utilizando os primers GP5+/6+, a detecção de HPV foi positiva em 27/57 (47%) mulheres HIV-positivas e em 15/57 (26%) mulheres HIV-negativas. Com os primers MY09/11, a detecção foi positiva em 35/57 (61%) mulheres HIV-positivas e em 17/57 (30%) mulheres HIV-negativas. Utilizando os primers PGMY09/11, a detecção de HPV foi positiva em 41/57 (72%) mulheres HIV-positivas e em 21/57 (37%) HIV-negativas. Para os dois grupos de pacientes o índice de detecção para o primer PGMY09/11 foi o maior entre as três metodologias. A comparação entre os resultados obtidos demonstrou concordância moderada entre os conjuntos de primers GP5+/GP6+ e MY09/11 ($k=0.57$ e $K=0.51$) e GP5+/GP6+ e

PGMY09/11($k=0.6$ e $k=0.52$) e concordância substancial entre os conjuntos de primers MY09/11 e PGMY09/11 ($k=0.61$ e $k=0.61$) para os dois grupos de pacientes, respectivamente.

Palavras-chave: HPV, câncer cervical, HIV, PCR, primers, PGMY

Abstract

The well known role of HPV in the development of cervical cancer represents the required reasons for the improvement of HPV molecular tests in gynecological routine. HPV detection is important for the earlier diagnosis of precursor lesions reducing the risks for cervical cancer progression. Sequence variations in the early and late regions of HPV genome result in the multiple HPV genotypes. Those variations determine variable, grade transformation and the oncogenic potential of the virus. Therefore such variable genomic regions can be exploited for the development of molecular type-specific tests or tests that can detect multiple HPV types as possible. Two different methods are available for HPV detection, including direct hybridization (Southern blot, dot blot and *in situ* hybridization) and gene amplification (PCR based assays). Consensus PCR based assays allow the detection of a great number of HPV types in a single reaction. Primers are designed for highly conserved regions of different HPV genotypes. The aim of this study was to compare three PCR based methods commonly used in HPV detection: GP5+/GP6+ general primers assay, MY09/11 degenerated primers assay and PGMY09/11 consensus primers assay in 120 cervical scrapes (60 obtained from HIV positive women and 60 from a control group). HPV detection achieved by PCR methodology, using the GP5+/GP6+ primers gave a detection rate of 27/57 (47%) in HIV positive women and 15/57 (26%) in HIV negative women; using MY09/11 primers the detection rate was 35/57 (61%) in HIV positive women and 17/57 (30%) in HIV negative women; and PGMY primers gave 41/57 (72%) e 21/57 (37%) in HIV positive and HIV negative women, respectively. Among the three methods evaluated in this study, the PGMY09/11 system gave the highest HPV detecting rates for the two groups of patients. Comparison between results showed moderate agreement among the GP5+/GP6+ and MY09/11 ($k=0.57$ e $K=0.51$) primers systems and between GP5+/GP6+ and PGMY09/11 ($k=0.6$ e $k=0.52$) primers systems and substantial agreement between MY09/11 and PGMY09/11 ($k=0.61$ e $k=0.61$) primers systems for both group of patients.

Keywords: HPV, cervical cancer, HIV, PCR, primers, PGMY

I - Introdução

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA de dupla fita que pertence à família dos *Papovaviridae*, gênero Papilomavírus, sendo específicos para células epiteliais, incluindo pele e mucosa do aparelho respiratório e do trato genital. Os tipos de HPV que infectam o trato genital são classificados de acordo com seu potencial relativo de malignidade, incluindo os HPV de baixo risco, HPV de risco intermediário e HPV de alto risco (Janicek *et al.*, 2001). O HPV é transmitido sexualmente, sendo aceito como o agente etiológico central na gênese de tumores cervicais, pois mais de 90% desse tipo de câncer apresenta DNA do HPV (Strickler *et al.*, 2003). As infecções por HPV estão associadas com lesões cutâneas e do epitélio mucoso.

Mais de 100 tipos diferentes de HPVs já foram identificados (Franco & Harper, 2005) dos quais, cerca de 40 tipos foram detectados em carcinomas cervicais e suas lesões precursoras, as denominadas lesões intraepiteliais escamosas (SIL: *squamous intraepithelial lesion*) (Levi *et al.* 2002 a; Ginocchio *et al.*, 2008), comumente classificadas como lesões de baixo grau (LSIL: *low grade squamous intraepithelial lesion*) e lesões de alto grau (HSIL: *high grade squamous intraepithelial lesion*).

O HPV é considerado um vírus tão comum, que mais da metade da população adulta mundial será infectada pelo HPV em algum momento da vida e pelo menos 80% das mulheres serão infectadas pelo HPV até a idade dos 50 anos. Tipos oncogênicos do HPV estão associados com 99,7% de todos os cânceres cervicais, assim como aos diferentes graus de doenças cervicais (Ault, 2005).

O câncer cervical é o segundo tipo mais frequente de câncer em mulheres no mundo inteiro (Franco & Harper, 2005; Ginocchio *et al.*, 2008), superado apenas pelo câncer de mama. No Brasil, estima-se que o câncer cervical seja o terceiro tipo mais comum de neoplasia maligna e a quarta maior cause de óbitos entre as mulheres (Freitas *et al.*, 2007), sendo que em 2008, foi estimado o surgimento de 18.680 novos casos no Brasil, segundo Instituto Nacional de Câncer, INCA (Brasil, 2008).

O colo do útero é uma estrutura anatômica que se estende para dentro da porção superior da vagina contendo o canal endocervical que une a cavidade uterina à vagina. A porção superior do canal endocervical, alvo frequente das infecções pelos diversos tipos de HPV é denominada endocérvice, revestida por uma única camada de células secretoras de muco. Já a parte inferior do canal endocervical, voltada para a extremidade da vagina e mais exposta ao ambiente hostil, é denominada ectocérvice, revestida por epitélio escamoso espesso, semelhante ao da vagina. A carcinogênese cervical associada ao HPV afeta a população de células de reserva de uma região cervical específica, a junção escamo-colunar (JEC) (Saddi, 2004). A JEC é uma área de rápida modificação celular e sítio principal das transformações oncogênicas (Canavan & Doshi, 2000). Histologicamente, os papilomavírus infectam a população de células precursoras (*stem cells*) da zona de transformação do epitélio cervical. Essas células, que detêm a capacidade de diferenciação em células de linhagem escamosa, glandular ou neuroendócrina, são responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio da cérvice.

Nas células comprometidas com a diferenciação escamosa, existe um programa de maturação altamente organizado que mantém a espessura epitelial, tanto pelos aspectos morfológicos quanto moleculares. No epitélio escamoso, as únicas células capazes de sofrer divisão celular são as da camada basal ou parabasal. Em células basais morfológicamente normais, mas infectadas pelo HPV, a expressão de genes virais encontra-se inibida, em níveis reduzidos. A expressão produtiva de genes do HPV é rigorosamente regulada, sendo permitida somente nas células que iniciaram a maturação escamosa com concomitante perda de capacidade proliferativa (Stoler *et al.*, 1986; 1989; Dollard *et al.*, 1992).

Na zona suprabasal imediata, a expressão de genes virais precoces já pode ser observada e durante a diferenciação celular, tem-se a indução de todos os genes virais, bem como a síntese de DNA viral, levando à montagem e produção de virions nas células mais próximas da superfície do epitélio. Essas alterações moleculares compatíveis com a infecção pelo HPV resultam em uma série de alterações morfológicas das células infectadas, permitindo a detecção da infecção viral e das lesões precursoras dos carcinomas cervicais por meio dos exames citológicos de rotina (Saddi, 2004).

Além dos exames citológicos convencionais, a detecção do DNA do HPV em células cervicais permite o diagnóstico precoce da infecção pelo HPV, possibilitando intervenções durante o desenvolvimento de lesões precursoras e dessa forma, diminuindo o risco de progressão para câncer cervical. Diferenças nas sequências de nucleotídeos que determinam as regiões precoces e tardias do genoma do HPV resultam na existência dos diversos tipos de HPVs conhecidos. Essas variações também são responsáveis pelo grau de transformação e potencial oncogênico do vírus. Assim, tais regiões podem ser exploradas para o desenvolvimento de testes moleculares tipo-específicos ou que envolvam o maior número possível de tipos de HPV (Saddi, 2004).

Dois grupos de métodos moleculares principais para a detecção de HPV encontram-se disponíveis. Aqueles que envolvem a hibridização direta de sondas com segmentos do genoma viral, incluindo os métodos de *Southern blot*, *dot blot*, e hibridização *in situ*, e aqueles que envolvem a amplificação de fragmentos do genoma viral e que incluem as técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase – PCR. As metodologias baseadas em PCR, utilizando primers consensuais, permitem a detecção de um grande número de tipos de HPV, simultaneamente. Os primers são desenvolvidos tendo como alvo regiões conservadas do genoma do HPV entre diferentes tipos virais.

O objetivo deste estudo foi avaliar a infecção pelo HPV em dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas, comparando as três metodologias baseadas em PCR mais utilizadas atualmente na detecção do HPV e que utilizam os diferentes conjuntos de primers conhecidos como GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11. A sensibilidade dos diferentes métodos e a concordância entre os resultados obtidos foram investigados em amostras cervicais obtidas dos dois diferentes grupos de mulheres.

I.1 – O PAPILOMAVIRUS HUMANO

O papilomavírus humano, pertencente à família *Papovaviridae*, é um vírus DNA de dupla fita circular, com aproximadamente 8 Kb (Franco *et al.*, 2001). O genoma do HPV (Figura 1) pode ser dividido em molduras abertas de leitura (ORFs: *open reading frames*) que codificam proteínas expressas precocemente (E1 a E7, *E* do inglês: *early*) e tardiamente (L1 e L2, *L* do inglês:

late) durante a infecção. As regiões L1 e L2 codificam duas proteínas do capsídeo viral, enquanto as regiões precoces codificam proteínas que estão envolvidas na regulação da replicação do DNA e na proliferação celular. O capsídeo não envelopado do HPV tem uma simetria icosaédrica contendo 22 capsômeros com um diâmetro de 52-55nm. Já a região longa de controle (LCR: *long region control*) compreende cerca de 10% do genoma viral e contém sequências importantes pra a regulação da replicação viral e a transcrição dos genes precoces. O segmento central da LCR dos HPVs de alto risco compreende um acentuador celular epitelial específico que contém diversos sítios de ligação para fatores de transcrição viral e celular (Sichero & Villa, 2006). Os mais de 100 tipos diferentes de HPV conhecidos são caracterizados com base nas diferenças das sequências dos nucleotídeos da região L1 (Dehn *et al.*, 2006)

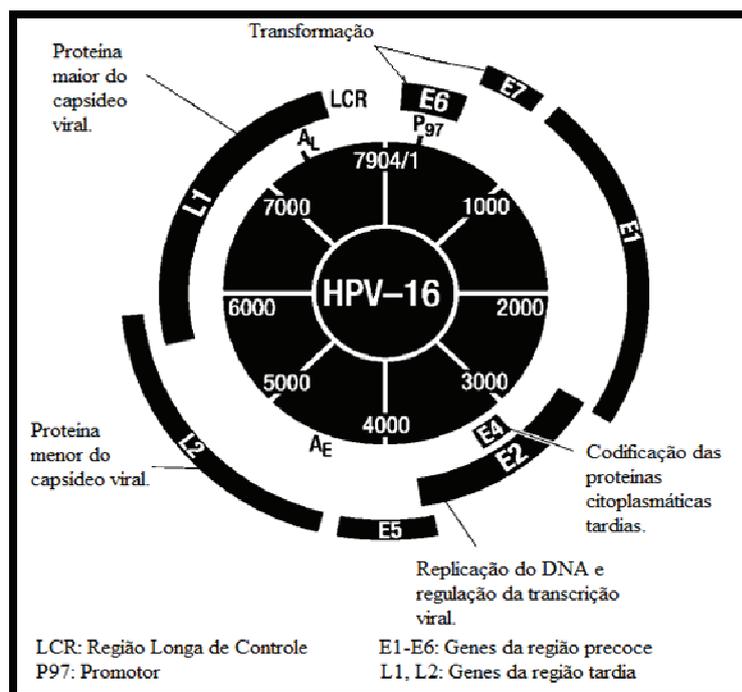


Figura 1. Mapa genômico do HPV 16, considerado o protótipo de genoma de todos os tipos de HPV. (Modificado de Hubard, R.A., 2003).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), os HPVs são classificados de acordo com o potencial oncogênico, primariamente com base na frequência de associação com o câncer cervical.

Os HPVs oncogênicos ou de alto risco para o câncer cervical incluem os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. Os HPVs que apresentam provável alto risco incluem os tipos 26, 53 e 66 e os HPVs de baixo risco incluem os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108. Os HPVs de baixo risco podem causar lesões benignas, subclínicas e clínicas conhecidas como lesões planas e condilomas, respectivamente. Os HPVs não listados acima são considerados como de risco indeterminado (Franco, 2003).

Tanto a incidência quanto a mortalidade feminina mundial devidas ao câncer cervical ficam atrás apenas do câncer de mama e, na maioria dos países em desenvolvimento, representam a maior causa de morte nas mulheres em idade reprodutiva. A idade à primeira relação sexual, o número elevado de parceiros sexuais, a alta paridade, o fumo, e o baixo poder sócio-econômico surgem como fatores de risco significativos para o surgimento do câncer cervical, além do fator ligado à infecção pelo HPV. Infecções pelo HPV constituem as doenças sexualmente transmissíveis mais comuns dos tempos atuais. Infecções assintomáticas podem ser detectadas em 3-53% das mulheres sexualmente ativas em idade reprodutiva (de Sanjosé *et al.*, 1992; Clifford *et al.*, 2005). Na maioria dos casos, a infecção genital pelo HPV é transiente (Franco *et al.*; 2001; Villa & Denny, 2006) e a maioria dos indivíduos mostra eliminação do vírus no período de até um ano após a detecção (de Jong *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005). Assim, a grande maioria das SIL regride espontaneamente e, apenas uma minoria persiste ou progride para o câncer cervical (Xi *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2005; Vinokurova *et al.*, 2008).

A imunidade do indivíduo, o tipo infectante de HPV, a carga viral e o estado de integração do genoma do HPV exercem profundas implicações no prognóstico da infecção pelo HPV (Hart *et al.*, 2001; Weissenborn *et al.*, 2003). O risco para a neoplasia cervical é maior para mulheres que desenvolvem infecções persistentes e de longa duração, por tipos de HPVs de alto risco (Franco *et al.*, 1999; Ylitalo *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2002; Franco, 2003; Khan *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos demonstram uma correlação significativa entre uma alta carga viral de HPVs de alto risco e a progressão da infecção para lesões intraepiteliais cervicais e para o câncer cervical (Sun *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2005; Castle *et al.*, 2005; Flores-Munguia *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). A prevalência dos tipos de HPV de alto risco aumenta de acordo com o

aumento do grau da lesão (Swan *et al.* 1999). Entre os fatores de risco de maior importância para o desenvolvimento dessas neoplasias têm-se a imunossupressão, as infecções por genótipos de alto risco, a persistência das infecções e a alta carga viral do HPV (Bosch *et al.*, 1995; Liaw *et al.*, 1995).

I.2 – PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Os papilomavírus infectam preferencialmente as células epiteliais com capacidade de proliferação. O estado físico do genoma do HPV no núcleo das células e o potencial maligno da proliferação epitelial parecem estar fortemente associados (Park *et al.*, 1997; Hudelist *et al.*, 2004). Em lesões de baixo grau, o DNA viral existe na forma de plasmídeos extracromossômicos. Entretanto, na maioria dos cânceres, o DNA do HPV está predominantemente integrado aos cromossomas do hospedeiro (Gómez & Santos, 2007; Vinokurova *et al.*, 2008).

Alguns estudos mostram que a capacidade de integração do genoma do HPV ao genoma da célula hospedeira aumenta de acordo com a progressão da SIL para o câncer cervical. Essa observação é importante, porque a integração está associada com a perda da expressão da proteína E2 do HPV. Em situações normais a proteína E2 se liga aos sítios regulatórios de E2 na região longa de controle do genoma do HPV, levando a uma repressão da expressão de E6 e E7. A base molecular para a oncogenicidade no carcinoma cervical pode ser bem explicada pela regulação e função de E6 e E7. A expressão desses dois genes é necessária para a manutenção do fenótipo maligno e está sob a regulação do produto do gene E2. O gene E2 é interrompido durante a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, de forma que a quebra do gene E2 resulta na subsequente desrepressão de E6 e E7 (Gómez & Santos, 2007; Vinokurova *et al.*, 2008)

Por se tratar de um vírus com DNA circular e de fita dupla, o genoma do HPV precisa passar por um processo de linearização, a fim de se integrar ao genoma do hospedeiro. Quando a linearização ocorre, há uma subsequente interrupção na moldura aberta de leitura na região do gene E2 e a integração leva então à redução nos níveis de E2, com perda da repressão (mediada por E2) na expressão de E6 e E7. O aumento da expressão de E6 e E7, por sua vez, pode levar a uma maior instabilidade cromossômica, pelo aumento da atividade dessas proteínas, resultando em crescimento celular desordenado.

Quando o genoma do HPV se integra ao genoma do hospedeiro, a linearização do genoma viral geralmente ocorre com a interrupção do gene E2, levando à perda da função de E2, e conseqüente aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7, que contribuem para a instabilidade cromossômica (Figura 2). Associada aos fatores ambientais, a instabilidade cromossômica pode levar ao câncer invasivo (Palefsky, 2006).

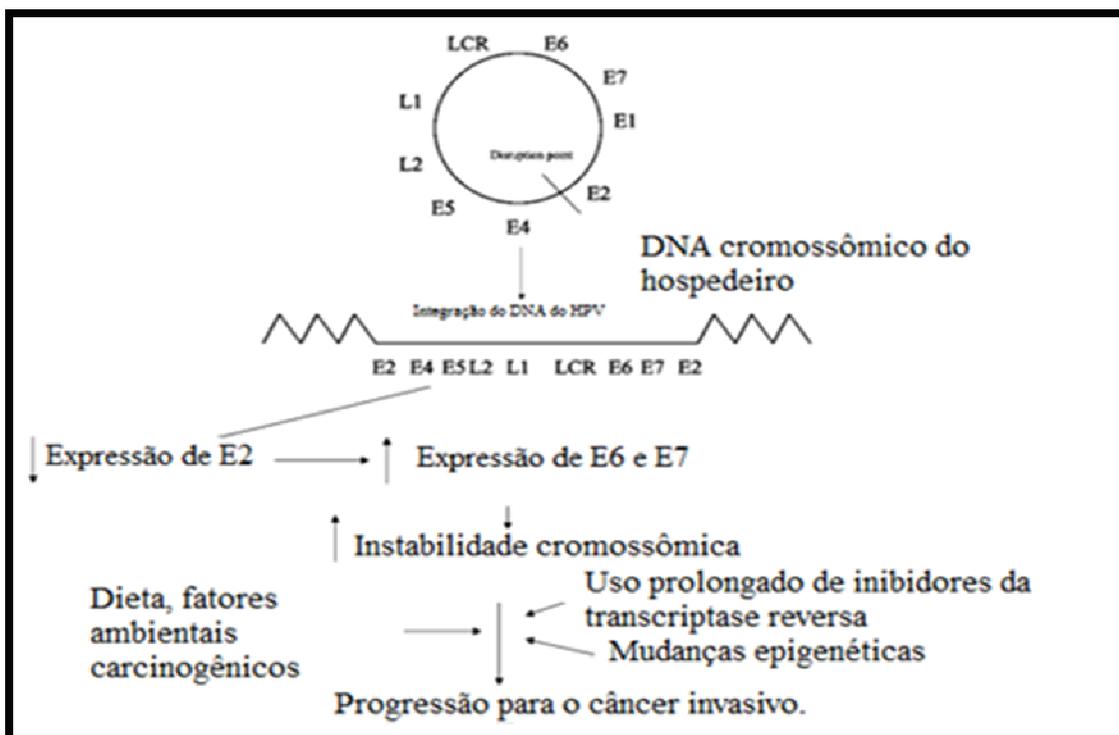


Figura 2. Papel da integração do genoma do HPV e instabilidade cromossômica na patogênese do câncer invasivo.

As células basais no epitélio escamoso estratificado e as células metaplásicas da junção escamocolunar da cérvix uterina são os principais alvos para o HPV, podendo infectar também o epitélio glandular da endocérvice, resultando em neoplasmas glandulares, como adenocarcinomas *in situ* ou adenocarcinomas invasivos (Figura 3) (Ault, 2005). O HPV precisa ter acesso às células basais do epitélio a fim de estabelecer uma infecção, o que geralmente ocorre devido às microlacerações da mucosa. Os primeiros sinais de transcrição das regiões precoces (E) do genoma viral podem ser vistos 4 semanas após a infecção. Entre as semanas 6 e 8, a replicação viral, a transcrição das regiões precoces e tardias (do inglês late) e a proliferação

celular atingem um platô (Schneider, 1993). A infecção pelo HPV parece ocorrer nas células basais e, interações entre a infecção pelo HPV e demais fatores ambientais resulta no desenvolvimento de SIL (Palefsky & Holly, 1995).

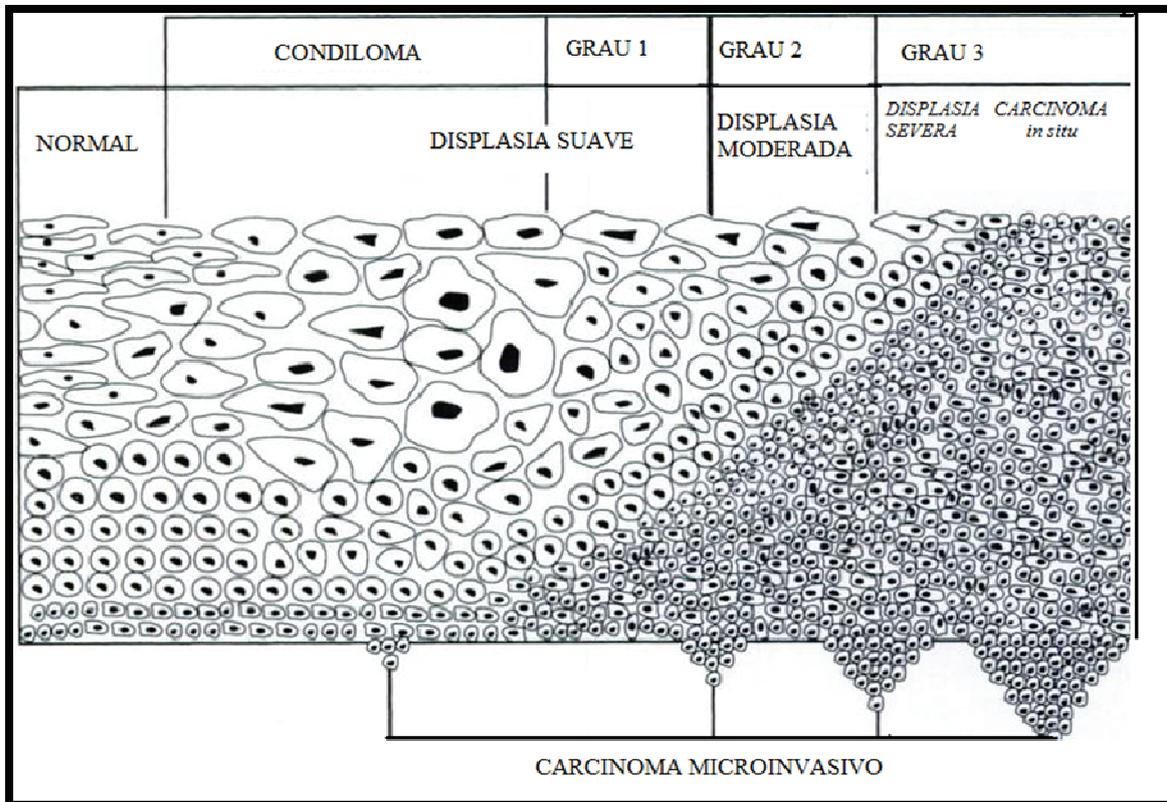


Figura 3. Representação esquemática de diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (Modificado de Palefsky & Holly, 1995).

Os produtos dos dois oncogenes dos HPVs de alto risco, E6 e E7, alteram o metabolismo da célula do hospedeiro e induzem a instabilidade genética (Pérez-Plasencia *et al.*, 2007), favorecendo o desenvolvimento neoplásico. A proteína E6 se liga à proteína p53 da célula hospedeira, induzindo sua degradação. Um dos efeitos dessa degradação é a inibição de apoptose nas células infectadas. A enzima telomerase também é ativada podendo aumentar ainda mais as chances de oncogenicidade. A proteína E7 tem um efeito similar no metabolismo celular, ligando-se à proteína do retinoblastoma (pRB) e inibindo sua função. Isso leva a uma interrupção do ciclo celular da célula hospedeira. Ligando-se a ela e alterando seu estado fosforilado, E7 inativa funcionalmente pRb que, assim como p53, também atua no controle do ciclo celular. Especificamente, a proteína pRb normalmente se

liga ao fator de transcrição E2F que atua na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. A presença de E7 resulta então em um complexo inativado E7-pRb, que desfaz a ligação da E2F a pRb (Figura 4), permitindo que E2F se ligue ao DNA e induza o crescimento e a proliferação celular (Janicek *et al.*, 2001; Gómez & Santos, 2007; Hebner *et al.*, 2007).

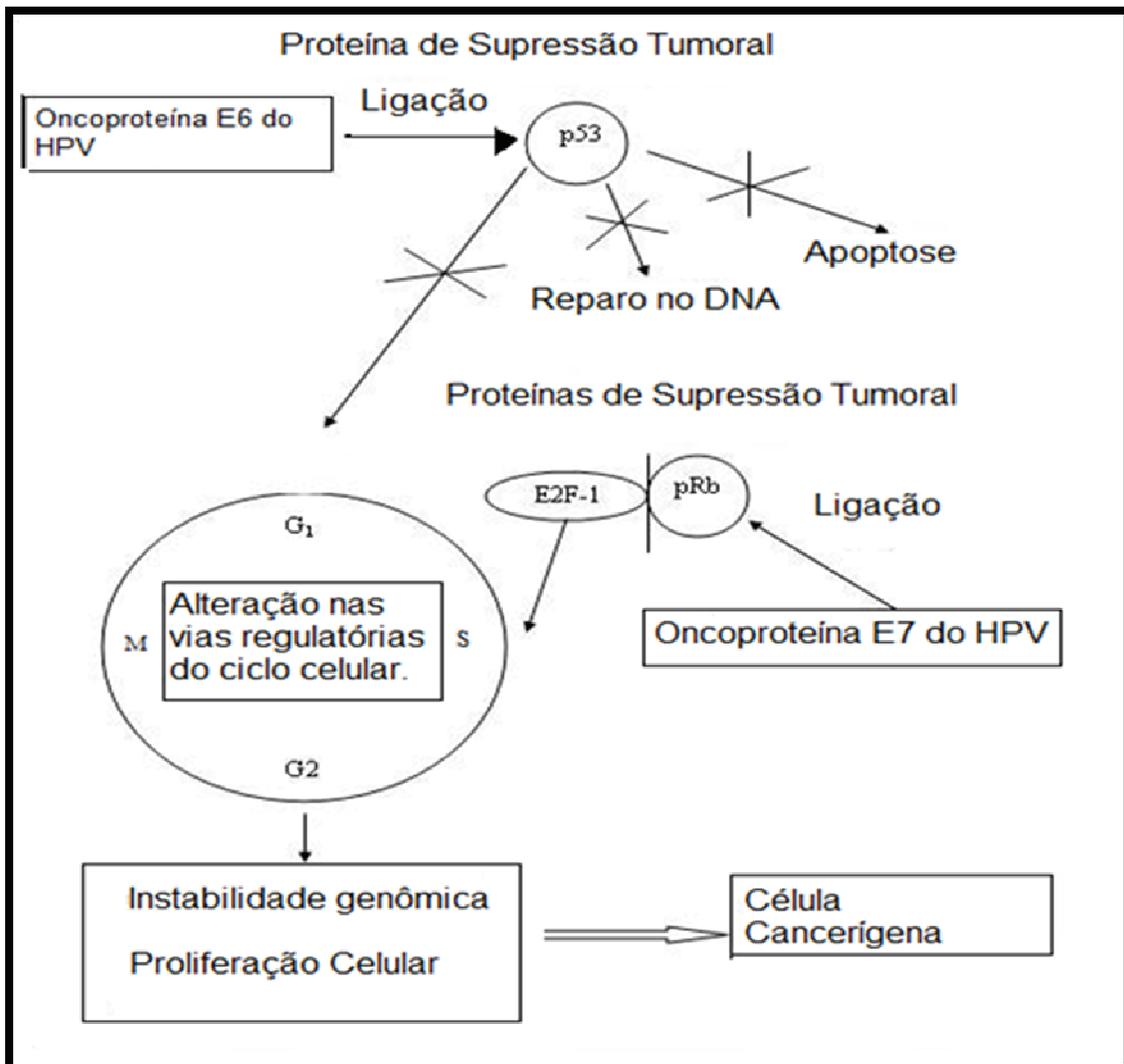


Figura 4. Mecanismos moleculares da infecção por HPVs oncogênicos. (Modificado de Gómez & Santos, 2007).

O grau de expressão de E6 e E7 está altamente relacionado com o tipo da lesão cervical, ou seja, em lesões de baixo grau, E6 e E7 são expressas em baixos níveis nas células basais e em níveis aumentados nas bordas superiores do epitélio. Neste tipo de lesão, o HPV se encontra na forma epissomal. Já em lesões de alto grau, E6 e E7 são expressas em níveis aumentados por todo o epitélio e o DNA do HPV é mais propenso a se integrar

no cromossomo da célula hospedeira. A integração do DNA do HPV à célula hospedeira aumenta a proliferação celular e a chance de progressão para a malignidade (Ault, 2005).

A infecção pelo HPV envolve sua entrada nas células epiteliais através dos limites basais e a produção de duas categorias gerais de mudanças no epitélio, sendo estas muito relevantes na hora de se fazer o diagnóstico. A primeira mudança está relacionada com o efeito citopático viral nas células maduras, já diferenciadas, o que inclui as atipias coilocíticas. É importante notar que esse processo ocorre em células maduras, incapazes de se dividirem. A segunda mudança é uma anormalidade nas características de crescimento e diferenciação do epitélio. As atipias citológicas são provenientes dessas alterações moleculares associadas com um aumento do DNA celular e da atividade proliferativa. O grau e a distribuição da atipia celular, combinada com a distribuição das células que apresentam atividade proliferativa, fornecem evidências de um epitélio infectado por HPV ou de um epitélio normal, o que traz um benefício muito grande para o diagnóstico correto (Crum, 2000).

Os HPVs de alto risco iniciam uma série de eventos moleculares que atuam modificando as funções normais do ciclo celular, alterações que podem causar maior susceptibilidade a danos no DNA e desarranjos cromossomais progressivos. Essas alterações são frequentemente acompanhadas por integração do vírus ao genoma do hospedeiro como descrito anteriormente. Essa integração viral garante a expressão contínua dos oncogenes virais (Crum, 2000).

Assim, os passos que ocorrem desde a infecção inicial até o desenvolvimento do câncer incluem quedas na resistência imunológica do hospedeiro, possível integração do DNA do HPV nas células hospedeiras e o acúmulo de mutações adicionais nessas células. A infecção pelo HPV precisa ser persistente no epitélio do hospedeiro como primeiro passo para posteriores mudanças neoplásicas. A forte correlação entre infecção por tipos oncogênicos de HPV e LSIL, HSIL e câncer cervical sugere que os testes para detecção do DNA do HPV representam uma ferramenta muito útil no gerenciamento de mulheres com testes de *Papanicolaou* anormais, especialmente naqueles casos em que existam resultados equivocados ou duvidosos (Ault, 2005)

I.3 – FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO PELO HPV

Um risco aumentado para aquisição de infecção pelo HPV e de desenvolvimento de câncer cervical está relacionado a uma série de fatores sexuais, a saber, idade precoce à primeira relação sexual, número elevado de parceiros ao longo da vida, promiscuidade do parceiro (Schiffman & Brinton, 1995; Dames *et al.*, 2009), histórico de prostituição e a irregularidade no uso de preservativos.

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também tem sido associada a uma alta prevalência de HPV, com uma maior incidência de SIL (Palefsky *et al.*, 1999) e aumento do risco de câncer cervical em mulheres HIV-positivas (Weissenborn *et al.* 2003). O HIV altera a história natural das infecções por HPV (Sun *et al.* 1997). Dentre as mulheres HIV-negativas infectadas pelo HPV, apenas uma minoria desenvolve infecção persistente que progride até SIL ou câncer (Levi, *et al.*, 2002. b). O contato com HPV geralmente resulta em uma infecção transitória, com a maioria dos indivíduos mostrando eliminação do vírus no período de até um ano após a detecção (de Jong *et al.* 2004).

Assim, a condição imunológica das pacientes é considerada como um fator crucial nas infecções por HPV e pode determinar a persistência da infecção primária, aumentando o risco de desenvolvimento de neoplasia cervical. Mulheres imunodeprimidas apresentam maior risco para malignidades ginecológicas. Uma vez que o HIV induz profundas alterações na resposta imune, atenção especial tem sido dada ao papel da infecção pelo HIV e sua influência na patogênese das doenças cervicais associadas ao HPV. A infecção pelo HIV pode influenciar a patogênese das doenças cervicais associadas ao HPV tanto diretamente, por meio de interações moleculares entre genes virais, quanto indiretamente, por meio de efeitos no funcionamento da imunidade de indivíduos HIV-positivos (Braun, 1994; Palefsky, 2006).

Além disso, alta carga viral com tipos oncogênicos de HPV tem sido considerada por vários autores como um fator de risco para o desenvolvimento de lesões de alto grau e para o câncer cervical (Tsai *et al.*, 2005). O alto número de partículas virais nas células cervicais parece favorecer a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. A carga viral parece ter uma correlação positiva com risco aumentado de lesão cervical e pode ser

considerada um marcador de grande valor na predição da doença cervical. Mulheres que apresentam altas cargas virais apresentam lesões de grau mais avançado e maior risco de progressão para o câncer cervical (Josefsson *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002). Estudos de avaliação de carga viral, utilizando PCR em tempo real, demonstram que altas cargas virais de HPV estão associadas com a presença de alterações citológicas cervicais, principalmente quando o HPV16 estiver presente (Moberg *et al.*, 2003), e com maior severidade e maior risco de progressão para o câncer cervical (Flores-Munguia *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2006).

Vários estudos têm sugerido uma relação entre o aumento da carga viral do HPV e o maior risco de SIL em mulheres HIV-positivas. Um desses estudos demonstra que a carga viral do HPV-16 (tipo de HPV associado a aproximadamente 50% dos cânceres cervicais), por exemplo, aumenta de acordo com a diminuição da contagem de linfócitos T CD4+ (Lefevre *et al.*, 2004), o que pode significar que, frente a um quadro de imunossupressão, as infecções por HPV tornam-se mais severas e mais freqüentes (Levi *et al.*, 2005), com maior carga viral e maior risco de progressão para neoplasia. Múltiplos genótipos de HPV também são encontrados em pacientes HIV-positivas, que apresentam câncer cervical (Lillo *et al.*, 2005). Os tipos mais prevalentes são aqueles de alto risco oncogênico, como HPV-16, -18, -31 (Heard *et al.*, 2000; Strickler *et al.*, 2003; Palefsky & Holly, 2003).

Uma possível explicação para esse quadro considera a ineficiência do sistema imune debilitado em eliminar a infecção pelo HPV, fato que aumenta a persistência do vírus no organismo. Frente à exposição contínua, tem-se o acúmulo de diferentes tipos de HPVs, com carga viral aumentada e uma maior chance de integração do genoma viral no genoma das células hospedeiras, um evento que parece ser crucial para a progressão da infecção pelo HPV para as lesões neoplásicas. A interação entre HPV e HIV também parece ocorrer via proteínas virais, com as proteínas do HIV realçando os efeitos lesivos das proteínas do HPV (Klaes *et al.*, 1999; Heard *et al.*, 2000).

Alta prevalência de infecções pelo HPV, maior incidência de SIL (Palefsky *et al.*, 1999) e aumento do risco do câncer cervical são freqüentemente descritos em mulheres HIV –positivas. Em tais pacientes, as altas cargas virais de HPV, principalmente com a presença do HPV16,

relacionam-se com maior risco de progressão para a malignidade, tanto devido à grande quantidade de células infectadas pelo HPV, como pela presença de doses elevadas de oncoproteínas nas células hospedeiras (Weissenborn *et al.*, 2003). Estudos utilizando PCR em tempo real têm sugerido uma associação entre o aumento da carga viral do HPV16 e o maior risco de LIS em mulheres HIV-positivas (Lefevre *et al.*, 2004).

Na região central do Brasil, onde se localiza a cidade de Goiânia, o câncer cervical é a segunda causa mais comum de óbito entre as mulheres. Entretanto, poucos são os dados disponíveis acerca da prevalência e distribuição do HPV nessa região (Rabelo-Santos *et al.*, 2003). Na cidade de São Paulo, foi encontrada uma prevalência de 98% de HPV em mulheres HIV-positivas, assim como alta prevalência de infecção com múltiplos genótipos de HPV (78,9%) (Levi *et al.*, 2002 b).

I.3.1 - LESÕES CERVICAIS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO PELO HPV.

Com relação às lesões cervicais induzidas pela infecção com o HPV, mulheres HIV-positivas costumam ter prevalência ainda maior de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Ellerbrock *et al.*, 2000; Faria *et al.*, 2008) quando comparadas a pacientes HIV-negativas. Nas pacientes HIV-positivas, as infecções pelo HPV são persistentes e freqüentemente envolvem múltiplos genótipos virais (Villa & Denny, 2006), sendo os tipos oncogênicos -16 e -18 os mais prevalentes (Cappiello *et al.*, 1997; Gonçalves *et al.*, 1999; Palefsky *et al.*, 1999; Ellerbrock *et al.*, 2000; Heard *et al.*, 2000; Weissenborn *et al.*, 2003; Odida *et al.*, 2008). Acredita-se que a prevalência da infecção pelo HPV aumenta à medida que ocorre progressão do dano imunológico, associado à infecção pelo HIV. A persistência da infecção pelo HPV é inversamente proporcional à contagem de linfócitos T CD4+ e diretamente proporcional à carga viral do HIV (Heard *et al.*, 2000; Weissenborn *et al.*, 2003; Strickler *et al.*, 2005).

A co-infecção HIV e HPV é um fenômeno completamente previsível. Múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação sexual, baixo nível sócio-econômico e prática sexual sem proteção, são importantes fatores de risco comuns às duas infecções virais, porém existem poucos dados na literatura que sugerem um papel direto do HIV na patogênese da neoplasia

associada ao HPV. Sabe-se que o HIV-1 possui vários genes reguladores como *tat*, *rev* e *nef* que controlam a replicação viral quando ativados (Al-Daraji & Smith *et al.*, 2009). A proteína reguladora do HIV codificada pelo gene *tat-1* pode atuar sobre o gene E2 do HPV levando ao aumento da expressão das proteínas do HPV em pacientes co-infectadas (Vernon, 1993). Isto proporciona um mecanismo potencial para explicar a expressão genética intensificada do HPV em mulheres HIV-positivas. Alta contagem de RNA de HIV e contagem de linfócitos T-CD4 menor que 200 células por mm³ também estão associadas com maior incidência e persistência da infecção pelo HPV. Mulheres com HPV do tipo oncogênico, HIV-positivas e com baixa contagem de CD4 estão mais propensas a desenvolver SIL (Ault, 2005).

Mais de um terço das oito milhões de pessoas infectadas pelo HIV no mundo são mulheres e a AIDS vem se tornando rapidamente uma grande causa de óbito entre essas pacientes. Estudos demonstram uma associação significativa entre HPV e SIL entre as mulheres HIV-positivas e negativas. Mulheres HPV-positivas desenvolvem SIL numa proporção 8.1 vezes maior do que as mulheres HPV-negativas. Mandelblat e col, 1999, sugerem que o HIV seja um cofator na associação entre o HPV e a neoplasia cervical. Embora o mecanismo biológico preciso dessa interação ainda não seja totalmente conhecido, existem dois mecanismos potenciais: o HIV e seu efeito na função imune afeta a susceptibilidade e o potencial oncogênico do HPV; ou existe uma interação molecular entre as proteínas do HIV e do HPV. Mecanismos biológicos pelos quais a supressão imunológica pode facilitar os efeitos oncogênicos do HPV incluem o tempo da infecção, o aumento da carga viral do HPV, a replicação mais rápida do HPV e a persistência ou progressão da infecção (Mandelblat *et al.*, 1999)

Poucos dados sugerem um papel direto do HIV na patogênese das neoplasias associadas ao HPV, mas o HIV atenua a resposta imune específica ao HPV, o que pode permitir maior persistência de HSIL e tempo suficiente para o acúmulo de mudanças genéticas importantes para a progressão do câncer. Evidências recentes sugerem que aproximadamente metade das infecções causadas por HPV em pacientes HIV-positivas foram adquiridas em relações sexuais recentes, enquanto a outra metade representa a reativação de infecções pré-existentes (Strickler *et al.*, 2005). Imunossupressão mais

avançada parece estar associada com o aumento de replicação do HPV, aumentando a probabilidade de um determinado tipo de HPV ser detectado (Palefsky, 2006). Displasia cervical em mulheres HIV -positivas está associada a um quadro de lesões multifocais, maior incidência, progressão mais acelerada e maiores índices de recidiva quando comparadas com mulheres HIV-negativas. Ainda, mulheres HIV-positivas com câncer cervical invasivo tendem a ter doenças diagnosticadas em estados mais avançados, resistência à terapia e sobrevida diminuída (Janicek *et al.*, 2001). Pacientes HIV-positivas que apresentam câncer cervical, também apresentam uma característica metastásica incomum e estão relacionadas a um pior prognóstico do que pacientes HIV-negativas (Paulo *et al.*, 2007).

I.4 – MÉTODOS DE DETECÇÃO DO DNA DO HPV

O fato da infecção pelo HPV ser o fator causal do desenvolvimento de câncer cervical representa o requisito necessário para a inclusão dos testes de detecção de HPV na rotina ginecológica. A detecção do vírus pode ajudar na identificação precoce de lesões precursoras e dessa forma, diminuir o risco de progressão para o câncer cervical (Farthing *et al.*, 1994), além de tornar possível o rastreamento de um número maior de mulheres pré-dispostas ao câncer cervical (Riethmuller *et al.*, 2008). Antes, porém, de se adotar tais testes como rotina em laboratórios, os métodos precisam ser validados e estimativas precisas da prevalência dos tipos de HPV entre as diferentes populações mundiais devem ser bem estabelecidas (Schiffman *et al.*, 1991). Os testes envolvendo biologia molecular se tornaram disponíveis por volta dos anos 80, mas não começaram a ser utilizados em larga escala mundialmente, devido principalmente ao fato de que tais testes pareciam não detectar todos os tipos oncogênicos do HPV. O nível de sensibilidade de uma metodologia é usualmente definido como o limite de detecção ou como a menor quantidade de DNA disponível necessária para ser detectada. Já a especificidade determina o nível de precisão de uma metodologia. Para que uma metodologia seja precisa e confiável, o ideal é que, através dela, se obtenha o mínimo possível de resultados falso-negativos e falso-positivos (Hubbard, 2003).

Diferenças existentes nas regiões precoces e tardias do genoma do HPV implicam na existência dos diversos tipos de HPVs conhecidos. Essas

variações determinam o grau de transformação e o potencial oncogênico do vírus. Assim, essas regiões podem ser exploradas para o desenvolvimento de testes moleculares tipo-específicos ou que abranjam o maior número possível de tipos de HPV. O HPV é detectado pela presença do seu DNA na amostra (Farthing *et al.*, 1994). A relação entre o alto número de cópias do DNA do HPV e o aumento do risco de desenvolvimento do câncer cervical e suas lesões precursoras já foi exaustivamente discutida (Josefsson *et al.*, 2000; Zerbini *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2001; De Marco *et al.*, 2001; Peitsaro *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002; Bory *et al.*, 2002; Sherman *et al.*, 2003; Fontaine *et al.*, 2005; Castle *et al.*, 2005). Inúmeras investigações foram conduzidas no sentido de estabelecer e validar um método eficiente para detecção e quantificação do HPV em células cervicais (Flores-Munguia *et al.*, 2004; Hesselink *et al.*, 2005). Uma variedade de métodos moleculares encontra-se disponível para detecção e genotipagem do HPV em amostras biológicas (Cubie *et al.*, 2000).

Tecnologias de hibridização do DNA viral utilizando sondas luminescentes (captura híbrida, *Southern Blot*, hibridização *in situ*, *dot blot*) e métodos baseados na amplificação do genoma viral com o uso de primers ou sondas fluorescentes (PCR em tempo real) representam as principais e mais modernas opções disponíveis para detecção do genoma viral. Os testes de biologia molecular apresentam um alto valor diagnóstico em programas de prevenção de câncer cervical, a fim de selecionar mulheres com lesões histológicas suscetíveis à progressão para lesões de alto grau e carcinomas. Infecções persistentes com HPVs de alto risco são imprescindíveis para o desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e de câncer. A estimativa da prevalência do HPV depende da técnica utilizada para detecção do genoma viral do HPV, sendo que a análise por PCR tem-se mostrado como o método de detecção mais sensível (Ault, 2005).

Um diagnóstico correto pode ajudar na redução da incidência do câncer cervical e suas complicações. O uso de métodos moleculares determina o status real da infecção e permite a distinção entre linhagens para uma melhor definição das estratégias de tratamento a serem utilizadas. Dentre as técnicas utilizadas para a detecção de HPV, somente a técnica de captura híbrida foi aprovada pela FDA (Food and Drugs Administration, agência governamental norte-americana, responsável pela regulamentação do desenvolvimento e

propaganda de drogas, artigos médicos, biológicos, alimentos, cosméticos, produtos eletrônicos emissores de radiação e produtos veterinários (Howland, RH. 2008), garantindo qualidade, eficácia e eficiência dos produtos produzidos) como técnica mais adequada para triagem a de mulheres juntamente com a citologia (Chacón *et al.*, 2007).

O método da hibridização direta baseia-se no pareamento complementar de uma sonda marcada para antígenos de HPV ou para os ácidos nucleicos do vírus. Sondas biotiniladas podem ser detectadas com substratos cromogênicos de rotina e o método pode ser automatizado para uso clínico. Melhoras na sensibilidade da técnica têm sido feitas por amplificação do sinal, uso de sondas fluorescentes, protocolos mais rigorosos, uso de nanosondas e combinações de técnicas diferentes. Uma vantagem da hibridização direta é que a infecção pelo HPV pode ser identificada em células específicas (células tumorais versus células normais) e o seu estado físico (episomal ou integrado) também pode ser determinado. Se o método for suficientemente sensível, o número de cópias do HPV integrado também pode ser estimado (Dehn *et al.*, 2006).

A hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica pela qual sequências nucleotídicas específicas são identificadas em células ou cortes de tecidos com morfologia conservada tendo como vantagem o fato de poder ser aplicada a amostras já fixadas e processadas e envolve a marcação do DNA com sondas e sua posterior visualização em microscópio de fluorescência. Uma desvantagem do método é a ocorrência de erros na tipagem do HPV devido a hibridizações cruzadas entre as sondas utilizadas. A técnica de *Southern blot* para análise do genoma do HPV é um bom procedimento, sendo capaz de detectar HPV numa taxa de 5000 cópias por amostra. Entretanto, sua aplicação mundial é limitada porque envolve alto gasto de tempo, pode ser tecnicamente difícil de ser realizada e requer grande quantidade de DNA em bom estado, não podendo ser utilizada para qualquer tipo de amostra (Villa & Denny, 2006). Além disso, a técnica faz uso de sondas radioativas cuja visualização é dependente de interpretações subjetivas do técnico responsável. As técnicas de *dot blot* também mostraram ser eficientes na detecção, porém também fazem o uso de sondas radioativas (Farthing *et al.*, 1994).

Os testes envolvendo amplificação de segmentos gênicos por meio de PCR permitem multiplicação *in vitro* de regiões únicas do DNA, permitindo sua detecção mesmo na presença de contaminantes. Esse tipo de método é considerado o mais flexível e sensível entre todos os utilizados para detecção do DNA do HPV, podendo ser utilizado, não só para detecção, como também quantificação de carga viral, sequenciamento de DNA e análise de mutações. A região L1 é a mais frequentemente utilizada para desenvolvimento de metodologias baseadas em PCR, uma vez que essa região apresenta-se altamente conservada entre diversos tipos de HPV, o que facilita a detecção de uma maior quantidade de tipos virais em uma única reação. Por sua natureza, a PCR está muito sujeita a contaminações porque sequências previamente amplificadas podem contaminar amostras negativas e ocasionar a obtenção de resultados falso-positivos (Hubbard, 2003), sendo essa uma das principais desvantagens da técnica.

1.4.1 - Testes de Captura Híbrida II (HC)

Métodos de captura híbrida são comumente utilizados para a detecção do DNA do HPV e consistem de hibridização em meio líquido, não radioativos, relativamente rápidos e desenhados para detectar diferentes tipos de HPVs, classificados em dois grupos, os HPVs de alto risco e os HPVs de baixo risco (Clavel *et al.*, 1998; Abdel Aziz *et al.*, 2006). Os testes de captura híbrida, denominados “testes de segunda geração” (HC2), permitem uma avaliação semiquantitativa da carga viral do HPV. Os testes HC2 utilizam um coquetel de sondas de RNA, capazes de formar híbridos com o DNA de vários tipos virais (13 tipos de HPV de alto risco e 5 tipos de HPV de baixo risco). Esses híbridos são capturados por anticorpos fixados às paredes das cavidades de microplacas de titulação. Os híbridos capturados pelos anticorpos são imobilizados nas placas e detectados após uma série de reações (Figura 5), que resultam na emissão de produtos luminescentes, que podem então ser quantificados em um luminômetro. A intensidade da luz emitida, expressa em unidades relativas de luz (URL), é proporcional à quantidade de DNA viral presente na amostra, fornecendo uma medida semiquantitativa da carga viral (Villa & Denny, 2006) e indicando a presença ou a ausência do DNA do vírus.

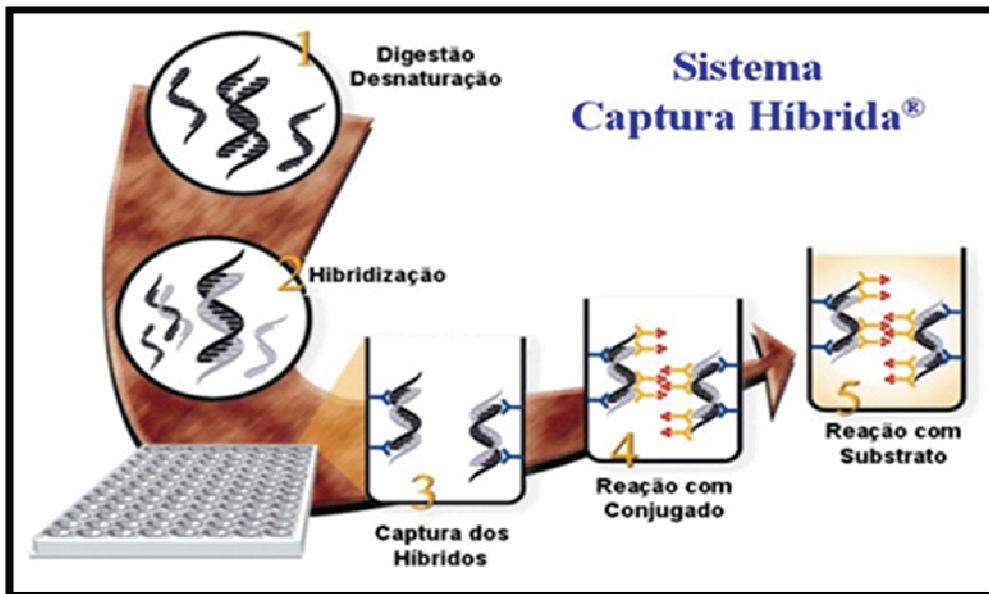


Figura 5. Esquema representativo da técnica de captura híbrida. (Disponível em: <http://www.ipog.com.br/captura.htm>).

Estudos usando testes HC2 demonstram que altas cargas virais de HPV estão associadas com a presença de alterações citológicas cervicais (Carvalho *et al.*, 2003; Gravitt *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005; Abdel Aziz *et al.*, 2006) e com a severidade de tais alterações, ou seja, as mulheres que apresentam altas cargas virais, detectadas por HC2, apresentam lesões de grau mais avançado e maior risco de progressão para o câncer cervical (Sun *et al.*, 2002; Josefsson *et al.*, 2000). Entretanto, nem todos os estudos que utilizaram os testes HC2 foram capazes de demonstrar essas correlações (Sherman *et al.*, 2003). Quando analisados em conjunto, os resultados apresentados ainda não são capazes de demonstrar claramente o papel da carga viral do HPV na carcinogênese cervical.

As limitações do método, incluindo a falta de ajuste dos resultados quanto ao número de células presentes na amostra analisada, associadas com a incapacidade de identificação do tipo viral, resultam em avaliações imprecisas da carga viral, dificultando a interpretação dos resultados. Entretanto, esse método vem sendo amplamente utilizado na clínica (Novaes *et al.*, 2006). A recomendação clínica clássica para a investigação do HPV por captura híbrida é o achado de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC – US) em testes de *Papanicolaou*. Os testes de captura híbrida detectam tipos oncogênicos de HPV na maioria das lesões cervicais

displásicas. Quanto maior o grau da lesão, mais provável é de se encontrar HPV na amostra. A metodologia é simples e pode ser utilizada em larga escala, não apresenta grandes riscos de contaminação, uma vez que não envolve amplificação, o que diminui os resultados falso-positivos (Farthing *et al.*, 1994).

A detecção de HPV de alto risco por um teste de biologia molecular pode facilitar o diagnóstico, evitando risco de evolução patológica e a necessidade de exames sequenciais de *Papanicolaou*. Sempre que os resultados da citologia e da captura híbrida forem discordantes, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode esclarecer a questão.

1.4.2 - Testes Baseados em Amplificação por PCR

A PCR é um método que permite a amplificação *in vitro* de regiões específicas do DNA utilizando atividade enzimática. O emprego da PCR nos estudos de detecção de HPV em amostras cervicais foi crucial para o estabelecimento da estreita correlação entre a presença do genoma viral e o câncer cervical. A PCR torna possível tanto a detecção como a determinação do tipo viral do HPV em amostras biológicas (Flores-Munguia *et al.*, 2004).

Esse método permite o uso de pequenas quantidades de DNA, uma vez que uma seqüência pode ser amplificada milhões de vezes em algumas horas. Para isso, são desenvolvidos primers complementares a uma região alvo do DNA que se pretende amplificar, e adicionados a uma mistura que contém nucleotídeos livres, cloreto de magnésio e a enzima Taq DNA-Polimerase. Após alguns ciclos de reações que envolvem desnaturação da molécula de DNA, anelamento dos primers à seqüência complementar e extensão da cadeia amplificada pela ação da enzima termoestável Taq DNA-Polimerase, são formadas milhões de cópias idênticas à seqüência alvo (Figura 6). O DNA do HPV pode ser amplificado seletivamente por uma série de reações que levam a um aumento exponencial e reproduzível das seqüências virais presentes nos espécimens biológicos. A análise do produto amplificado pode ser feita de diferentes maneiras incluindo eletroforese em gel, *dot blot* ou hibridização em fita. Nos últimos anos, uma variação do método de PCR, resultou no desenvolvimento de uma técnica baseada em amplificação de seqüências específicas de DNA com concomitante quantificação do produto formado (Iftner & Villa, 2003).

Os sistemas usados na PCR em tempo real são baseados na detecção e quantificação de um sinal fluorescente, que aumenta na proporção direta da quantidade de produto formado em cada ciclo de uma reação. A PCR em tempo real mede a quantidade de produto amplificado por PCR na medida em que ele é formado, ou seja, em tempo real. O método é capaz de medir a quantidade de produto ainda na fase exponencial da reação de PCR. Como nesta fase a quantidade de produto formada traduz de maneira eficiente a concentração inicial de moléculas moldes amplificadas, é possível inferir sobre a quantidade de uma sequência específica numa determinada amostra. A geração de um sinal fluorescente contínuo durante a reação é obtida pela utilização de compostos químicos (fluorocromos) desenvolvidos para este fim. As reações de PCR em tempo real são feitas em placas de 96 poços e dispensam a análise dos produtos de amplificação em géis, o que torna a técnica bastante atraente para a análise de um grande número de amostras (Iftner & Villa, 2003).

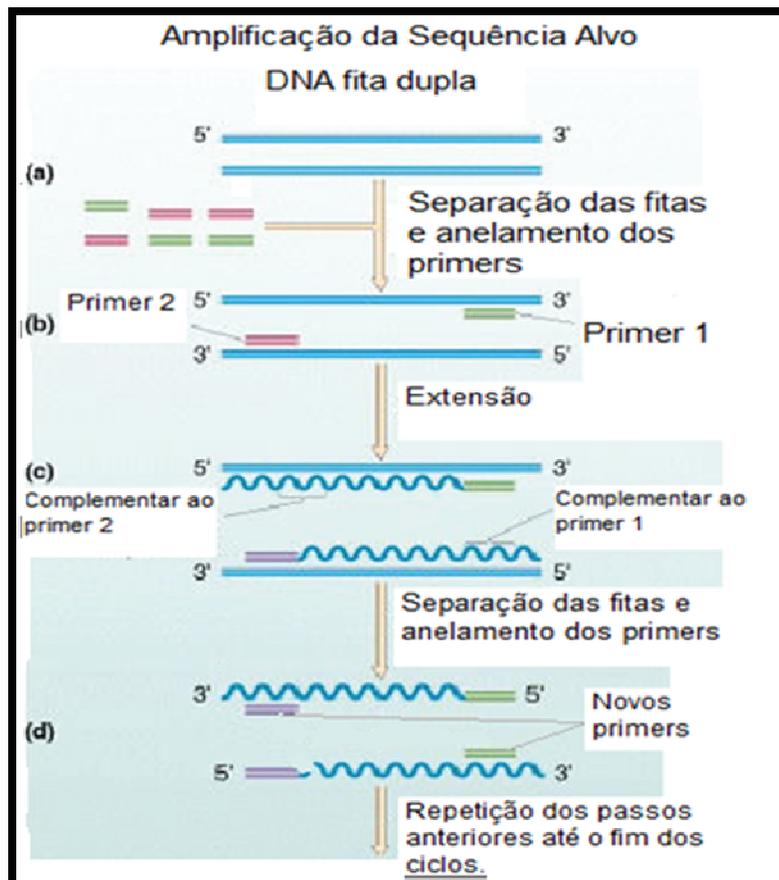


Figura 6. Esquema representativo da técnica de PCR. (Disponível em: <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr12-26.html>).

Combinando a PCR em tempo real com o uso de controles internos para a detecção de inibidores de PCR e quantificação do número de células presentes na amostra biológica, uma série de estudos recentes foi capaz de demonstrar que altas cargas de HPV estão significativamente associadas com o risco de desenvolvimento de lesões cervicais e com progressão das lesões cervicais para o câncer (Liaw *et al.*, 1999; Zerbini *et al.*, 2001; Peitsaro *et al.*, 2002; Moberg *et al.*, 2003). Trata-se, porém, de um método dispendioso, o que dificulta seu uso em massa nos laboratórios de análises clínicas e nos testes de triagem, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil

I.5 – PRIMERS USADOS NA DETECÇÃO DO HPV POR PCR CONVENCIONAL

A sensibilidade e a especificidade dos métodos baseados em PCR podem variar, dependendo principalmente do conjunto de primers utilizados na reação, do tamanho do fragmento amplificado, das condições da reação, do desempenho da DNA polimerase utilizada, do espectro do DNA amplificado e da habilidade em detectar múltiplos tipos de vírus. Os protocolos mais utilizados atualmente fazem uso de primers consensuais que apresentam como alvos regiões extremamente conservadas do gene L1 de diversos tipos de HPVs e são potencialmente capazes de detectar todos os tipos mucosos do vírus. Entre esses primers, destaca-se um par de primers consensuais, denominados GP5/GP6 e a versão estendida dos mesmos, denominados primers GP5+/GP6+, além dos primers degenerados MY09/11 e sua versão modificada PGMY09/11 (Villa & Denny, 2006). Sistemas de PCR usando múltiplos primers como o PGMY09/11, por exemplo, tem-se mostrado mais eficientes na detecção de infecções múltiplas do que sistemas que utilizam primers consensuais simples, como o GP5+/GP6+ (Iftner & Villa, 2003).

Com base no tipo de primer utilizado, dois tipos de testes baseados em PCR são descritos, os denominados primers tipo-específicos e os primers consensuais. Os protocolos tipo-específicos são desenvolvidos com o objetivo de se obter a amplificação do genoma de um único tipo de HPV (Dehn *et al.*, 2006), sendo mais utilizados para genotipagem do vírus. Porém, é necessária a realização em separado de múltiplas reações de PCR, culminando no aumento do tempo gasto e no maior custo para cada grupo de amostras a ser analisado.

As metodologias baseadas em PCR com primers consensuais permitem a detecção de um grande número de tipos de HPV simultaneamente. Os primers são desenvolvidos tendo como alvo regiões conservadas do genoma do HPV entre diferentes tipos. A região L1, além de ser altamente conservada, é utilizada para fins de classificação dos genótipos do HPV, sendo frequentemente usada como a região alvo para o desenvolvimento de primers para detecção do DNA do HPV (Iftner & Villa, 2003).

I.5.1 PRIMERS GENÉRICOS GP5/GP6

Como a PCR vem sendo amplamente utilizada para a detecção de HPV em amostras cervicais e espécimes de biópsia, várias modificações foram feitas na técnica, com o objetivo de se detectar múltiplos genótipos numa mesma reação. Isso requer a seleção de primers complementares às regiões conservadas de um grande número de genótipos do HPV. Até meados dos anos 90, apenas nove genótipos do HPV tinham sido completamente sequenciados, assim a extensão da conservação da sequência de um primer selecionado teria que ser determinada experimentalmente. Snijders e colaboradores (1990) desenharam duas sequências de primers genéricos para a região L1 do HPV-11 e que não diferiam em mais de duas bases nas sequências dos HPVs tipo 6b, 16, 18, 31 e 33. Esses primers foram considerados primers genéricos para HPVs infectantes do trato genital. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que os primers GP5/GP6 também poderiam ser usados na amplificação de genomas virais obtidos de amostras cervicais, biópsias de laringe e linhagens celulares relacionadas ao câncer cervical (Snijders *et al.*, 1990), sendo capazes de detectar até 27 tipos mucosotrópicos de HPV sob condições capazes de permitir diferenças de até 3 pares de bases entre os diferentes tipos (de Roda Husman *et al.*, 1995).

I.5.2 – PRIMERS GENÉRICOS GP5+/GP6+

Observando alguns estudos que utilizaram os primers GP5/GP6 na rotina, de Roda Husman e col.(1995) perceberam que algumas amostras apresentavam resultados ambíguos, refletidos por sinais fracos na análise dos produtos da reação de PCR e com co-amplificação de DNA celular. Esses achados eram considerados como resultado de reações com baixo rigor nas

condições de anelamento do primer, o que poderia comprometer a interpretação dos resultados. Numa tentativa de solucionar esses problemas foram feitas algumas modificações visando o aperfeiçoamento da sensibilidade do método e, simultaneamente, redução da amplificação inespecífica. Um aumento no tamanho dos primers contribuiu para uma amplificação mais eficiente do complexo primer – sequência alvo (Mack & Sninsky, 1988) e a presença de dois ou três nucleotídeos perfeitamente pareáveis na posição 3' dos primers resultou em um maior sucesso de amplificação. Utilizando-se dessas informações, de Roda Husman e col. (1995) investigaram se o alongamento do conjunto de primers GP5/GP6 na posição 3', utilizando sequências altamente conservadas, resultaria numa melhora na eficiência da PCR.

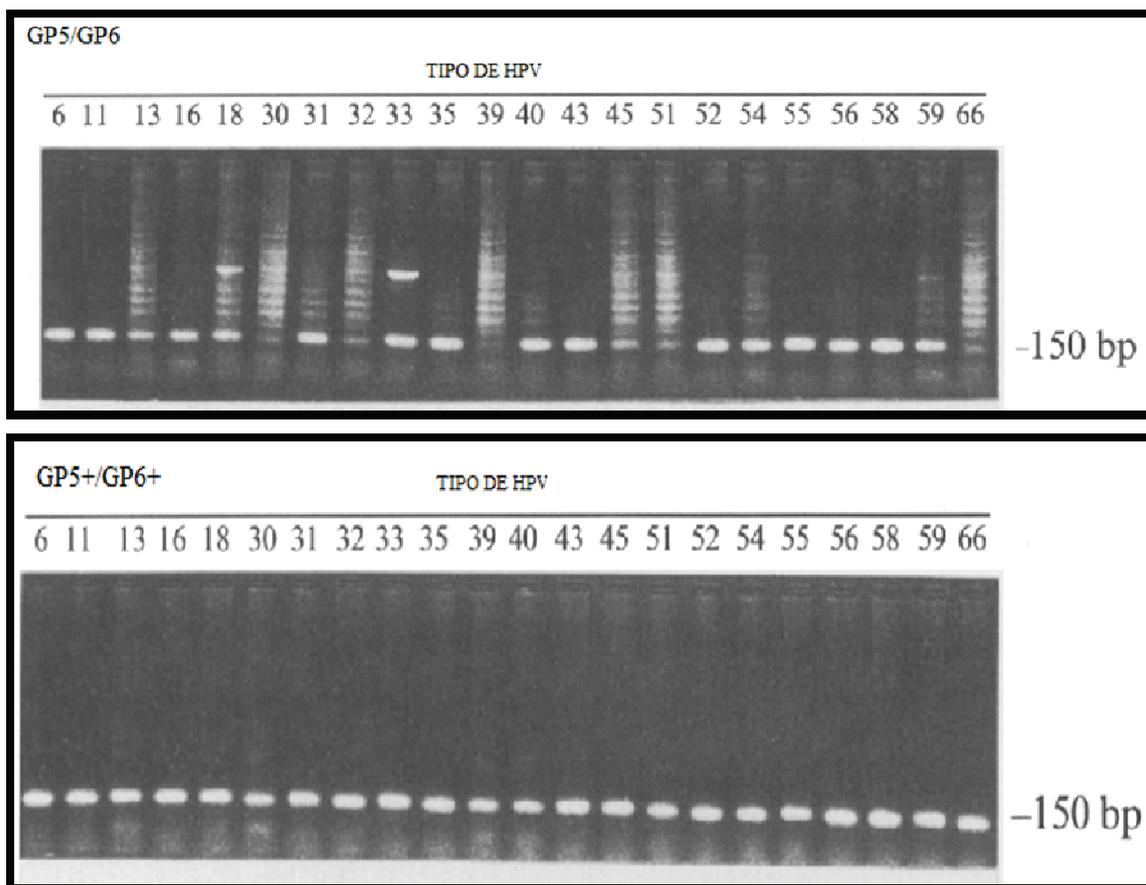


Figura 7. Comparação dos produtos de PCR após eletroforese em gel utilizando os primers GP5/GP6 e GP5+/GP6+, respectivamente. Os amplicons formados com 150pb estão indicados à direita. (Modificado de de Roda Husman *et al.*, 1995).

Para a modificação do primer GP5, um resíduo de timina (terceira posição do nucleotídeo do primeiro códon da treonina correspondente ao HPV-16) e os dois nucleotídeos (CA) codificantes para a segunda treonina foram adicionados ao final 3' do primer, que passou a ser denominado GP5+. Para a modificação do primer GP6, cinco nucleotídeos foram adicionados na região 3', sendo que esse primer passou a ser denominado GP6+. A sequência dos primers GP5+/GP6+ foi capaz de alinhar com as sequências correspondentes da região L1 de 23 diferentes genótipos de HPVs mucosotrópicos. Os amplicons formados com a utilização desses primers apresentam aproximadamente 150 pares de base, assim como aquele amplificado com os primers GP5/GP6. Entretanto, com essas modificações, a reação de PCR passou a apresentar menos co-amplificação de DNA celular (Figura 7), ganhando um aumento de especificidade (de Roda Husman *et al.*, 1995) e, conseqüentemente, aumento dos níveis de detecção do HPV.

I.5.3 – PRIMERS DEGENERADOS MY09/11

Quando esse sistema de primers foi desenvolvido, apenas 5 das mais de 20 seqüências dos genótipos de HPVs genitais tinham sido documentadas. Os primers foram então desenhados a partir da região L1 conservada dos tipos de HPV-6, -11, -16, -18 e -33, com a intenção de amplificar esses 5 genótipos e demais tipos de HPVs com sequências homólogas. As regiões escolhidas não eram completamente homólogas nem mesmo entre os cinco tipos de HPVs originais e as posições dos nucleotídeos heterogêneos foram completadas pela inclusão de bases degeneradas, nas quais não havia uma homologia completa, nem um pareamento rigoroso, o que poderia resultar numa menor sensibilidade da técnica.

Primers degenerados são sintetizados levando-se em conta a adição randomizada de um, dois ou mais nucleotídeos nas posições de degeneração. A inserção de bases nessas posições não é um processo controlado, de forma que não se pode garantir uma proporção igual de cada combinação da seqüência (Depuydt *et al.*, 2007) e nenhum método analítico disponível é capaz de verificar as proporções entre as seqüências. Assim, os primers designados MY09/11 compreendem uma mistura de 24 seqüências únicas de nucleotídeos,

capazes de detectar em torno de 30 tipos de HPVs genitais, com níveis variados de sensibilidade.

Os amplicons formados apresentam aproximadamente 450 pares de bases. Uma vez que a PCR é um método de amplificação que depende de uma sequência alvo de DNA para ocorrer, esse tamanho do amplicon pode levar a uma diminuição da eficiência da PCR caso a amostra a ser analisada tenha passado por processos capazes de degradar o DNA a ser amplificado e, conseqüentemente, resultar em uma elevação dos casos de resultados falso-negativos. Estudos realizados com os primers MY09/11 mostraram que a eficiência da amplificação varia sistematicamente entre os genótipos analisados. A eficiência da amplificação estaria relacionada ao número, posição e estabilidade do mau-pareamento (Gravitt *et al.*, 2000).

I.5.4 – PRIMERS CONSENSUAIS PGMY09/11

Numa tentativa de melhorar a eficiência, a sensibilidade, a reprodutibilidade e de acabar com as regiões degeneradas dos primers MY09/11 e dos demais primers consensuais, Gravitt e col., 2000, desenvolveram um conjunto de primers designados PGMY09/11, baseados nas mesmas regiões de anelamento usadas para os primers MY09/11. Evitando o método de bases degeneradas, foram agrupados diversos tipos virais com base na homologia seqüencial existente em cada uma das regiões de anelamento dos dois primers. Com base nesse agrupamento, foi desenhado um conjunto de cinco oligonucleotídeos com anelamento à montante, que foram denominados, em conjunto, PGMY11, e um conjunto de treze oligonucleotídeos com anelamento à jusante, denominados em conjunto, PGMY09. Cada primer integrante do sistema PGMY09/11 é sintetizado independentemente, permitindo a verificação da seqüência e da concentração de cada um. As condições de amplificação e controle para anelamento com seqüências de DNA endógeno seguiram as mesmas características dos primers MY09/11, havendo co-amplificação do gene da β -globina.

O fragmento amplificado após a reação de PCR também é formado por 450 pares de bases, porém, devido ao fato de não possuírem mais as regiões de degeneração, os primers apresentam maior complementariedade com as seqüências alvo, sendo capazes de detectar e genotipar de forma mais

sensível diversos tipos comuns de HPVs genitais, incluindo amostras com múltiplos genótipos. Estudos que utilizam os primers PGMY09/11 apresentam o potencial de reportar taxas maiores de detecção de infecções relacionadas ao HPV, não apenas quando da presença de novos tipos de HPVs, mas também para tipos de HPVs já bem conhecidos. (Coutlée *et al.*, 2002). A mudança efetivada no conjunto de primers PGMY09/11 proporcionou aumento na sensibilidade da técnica, maior eficiência para avaliação da carga viral e melhoria na detecção de tipos-específicos do HPV.

Apesar da grande variedade de métodos disponíveis para a detecção do DNA do HPV, o método de PCR tem-se mostrado como o mais sensível e confiável. Os conjuntos de primers consensuais que se ligam às regiões altamente conservadas do genoma do HPV têm sido usados na detecção de vários tipos conhecidos de HPV numa única reação (Dehn *et al.*, 2006) e todos se mostram efetivos na detecção, tanto de infecções por múltiplos tipos, quanto de infecções por tipo único de HPV.

II- Justificativas

O presente trabalho se justificou por:

a) Uma vez que o HPV desempenha um papel central na gênese dos tumores cervicais, o estudo de metodologias capazes de detectar o DNA do HPV em estágios precoces da infecção representa uma estratégia importante para prevenir a progressão das lesões precursoras para câncer cervical.

b) Apenas a metodologia de Captura Híbrida 2 foi aprovada pela FDA para utilização em rotina. Assim, existe a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias de detecção, principalmente as baseadas em PCR, para uso em laboratórios clínicos, a fim de tornar a detecção mais rápida, eficiente e com maiores benefícios para as pacientes;

c) Os estudos que comparam a detecção do HPV em pacientes HIV-positivas e HIV-negativas ainda são de extrema importância, a fim de melhor compreender a biologia da interação entre a infecção pelo HPV e a imunossupressão causada pelo HIV. Nenhum estudo de comparação entre os três principais e mais utilizados protocolos para detecção do DNA do HPV baseados na metodologia da PCR (utilizando os diferentes conjuntos de primers GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11) foi encontrado na literatura brasileira;

d) Uma vez que nos últimos anos, houve considerável aumento no número de mulheres infectadas pelo HIV e que a interação entre o HIV e o HPV ainda é incerta, maiores informações acerca desse assunto devem ser pesquisadas, possibilitando o desenvolvimento de formas mais seguras e eficientes de tratamento e prevenção para essas pacientes;

e) Com o início da era HAART (das terapias antiretrovirais - *Highly active antiretroviral therapy*), a frequência de alguns tumores relacionados ao HIV tem diminuído. Porém, a incidência do carcinoma cervical não mostrou ainda tendências de redução. Como a infecção pelo HPV parece estar aumentada em mulheres HIV-positivas, e esse aumento está relacionado à presença das lesões cervicais e do câncer cervical, a infecção pelo vírus HPV e imunossupressão causada pelo HIV devem ser melhor investigadas, justificando-se assim, a realização desse estudo.

III- Objetivos

III.1 – OBJETIVO GERAL:

Comparar a eficiência de três diferentes conjuntos de primers (GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11) usados em ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do HPV em mulheres HIV-positivas, atendidas pelo Centro de Apoio ao Doente com AIDS (CADA), e em mulheres HIV-negativas, atendidas pela Santa Casa de Misericórdia em Goiânia, Brasil.

III.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Detectar o genoma do HPV em 120 amostras cérvico-vaginais, obtidas de 60 mulheres HIV-positivas e 60 mulheres HIV-negativas, utilizando a reação em cadeia da polimerase e três conjuntos de primers genéricos: GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11;

b) Comparar a prevalência do HPV nos dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas;

c) Comparar os resultados das alterações citológicas cervicais diagnosticadas com a detecção do genoma viral pela técnica de PCR;

d) Avaliar o índice de concordância entre os resultados obtidos com os três conjuntos de primers utilizados;

IV - Metodologia

IV.1 – SELEÇÃO DE PACIENTES

O estudo, aprovado pelo COEP – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás (Anexo 1), incluiu 120 amostras cérvico-vaginais coletadas por médicos ginecologistas colaboradores do trabalho, sendo que destas amostras, 60 foram obtidas de mulheres HIV-positivas, assistidas pelo Centro de Apoio ao Doente com AIDS; e 60 amostras obtidas do grupo controle, composto por mulheres HIV-negativas. Todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos do projeto e receberam uma cópia do resumo do projeto de pesquisa, contendo os objetivos do estudo e os métodos de coleta. Os possíveis riscos, o destino do material coletado e a importância do projeto foram explicados às pacientes. Somente as pacientes que concordaram em participar voluntariamente do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 2) foram incluídas na pesquisa. Após assinatura do TCLE, as pacientes responderam a um questionário (ANEXO 3) contendo dados sócio-demográficos e comportamentais, sendo então encaminhadas para coleta de material ginecológico. A coleta tríplice vaginal foi realizada para cada paciente, sendo confeccionada uma lâmina para a análise citológica, feita pela Dra. Silvia Helena Rabelo, citopatologista colaboradora do trabalho e o restante do material armazenado em meio líquido de preservação (Universal Collection Medium – DIGENE), para posterior análise molecular utilizando a técnica de PCR. As amostras foram armazenadas em freezer a – 20 °C até a extração de DNA.

IV.2 – DETECÇÃO DO GENOMA DO HPV NOS ESPÉCIMES ENDOCERVICAIS UTILIZANDO ENSAIOS DE PCR:

IV.2.1 – Desenho do Experimento:

Dentre as 120 amostras obtidas, somente 114 amostras (57 HIV-positivas e 57 HIV-negativas) forneceram DNA passível de amplificação por PCR. Assim, 114 amostras foram testadas para a presença do HPV por meio

de PCR, utilizando-se os primers consensuais GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11. Cada amostra foi testada pelo menos três vezes com cada conjunto de primer para detecção de HPV a fim de que os resultados fossem confirmados e para evitar resultados falso-positivos e/ou falso-negativos devido a contaminações ou problemas ocorridos durante as reações de PCR.

IV.2.2 – Extração de DNA das amostras coletadas:

O material preservado em meio próprio (Universal Collection Medium - DIGENE) foi processado para extração de DNA. A extração foi feita utilizando-se o Kit de extração Wizard (Wizard Genomic DNA Purifications Kit - Promega - USA) e seguindo o protocolo do fabricante. Antes de iniciar a extração, as amostras foram centrifugadas para sedimentar o pellet de células e evitar a perda de material. Em torno de 200 µL de amostra foram incubados juntamente com 200 µL de solução de lise (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM e proteinase K 200µg/ml) a uma temperatura de 65 °C, por um período de 1 hora ou até a completa lise celular. Após a lise, foi feito o tratamento com RNase, e em seguida, foram adicionados 33µl de solução de precipitação de proteínas. As amostras foram colocadas no freezer por 15 minutos e, após esse período, foram centrifugadas por 5 minutos. O pellet formado permanecia no fundo do tubo, enquanto o sobrenadante era transferido para um novo microtubo ao qual foram adicionados 100µl de isopropanol gelado, misturados por inversão 50 vezes. Após centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante era descartado e o pellet de DNA lavado com 100µl de etanol 70%. Após o descarte do etanol, o pellet era então secado em estufa (40°C) por alguns minutos. Em seguida, o pellet era ressuscitado em cerca de 20µl de solução de hidratação. Os tubos eram então deixados à temperatura ambiente por cerca de 8 horas para re-hidratação do DNA e em seguida, armazenados em freezer a -8 °C até a preparação das reações de PCR.

IV.2.3 – Análise da qualidade do DNA extraído por meio de amplificação de um segmento do gene GAPDH:

A fim de verificar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores da PCR, um fragmento do DNA genômico de cerca de 90pb, contendo parte do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase),

considerado um gene constitutivo humano, foi amplificado para cada amostra de DNA extraído. As reações de PCR mediadas por primers específicos para GAPDH foram realizadas num volume final de 25 µl, utilizando um termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.). Os reagentes utilizados para as reações encontram-se descritos na tabela 1 e as condições de ciclagem encontram-se descritas na tabela 2.

Após o término da reação, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 8% (Anexo 4) corado com nitrato de prata (Anexo 4), para verificação de uma banda de aproximadamente 90 pb correspondente ao fragmento do gene GAPDH. As amostras positivas para a amplificação de GAPDH foram submetidas a reações de PCR para a detecção do DNA do HPV, utilizando três conjuntos de primers consensuais diferentes: GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11. As amostras negativas para o gene GAPDH tiveram o DNA re-extraído e foram novamente testadas para esse gene. Por se tratar de uma técnica sensível. A extração de DNA é feita repetidas vezes até que se consiga produto suficiente e de qualidade para realização da PCR. Somente as amostras positivas para o GAPDH foram utilizadas para detecção, restando um total de 57 amostras das pacientes HIV-positivas e 57 amostras obtidas de pacientes HIV-negativas.

Tabela 1. Descrição dos reagentes e respectivas concentrações ([]) utilizados na amplificação de um segmento do gene GAPDH.

Reagente [] inicial	[] final
Tampão 10x	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,0 mM
dNTPs (2mM)	0,2 mM
Taq polimerase (5 U/µL)	0,5 U
P1F1 (2,5 µM)	0,1 µM
P2F2 (2,5 µM)	0,1 µM
Amostra (DNA) (100 ng)	1,0 ng
H ₂ O milli-Q (q.s.p 50 µL)	q.s.p. 25µL
Total	25 µL

IV.2.4 - Detecção do genoma viral utilizando os primers genéricos GP5+/6+:

Utilizando os primers consensuais GP5+/GP6+, verifica-se que a presença do genoma viral é definida pelo aparecimento de uma banda com cerca de 150 pares de bases, correspondente à região L1 de vários tipos de HPVs (Tabela 3).

Tabela 2. Protocolo de Ciclagem da amplificação de GAPDH.

Temperatura	Tempo
95 ° C	5 min.
95 ° C	30 seg.*
59 ° C	1 min.*
72 ° C	1 min.*
72 ° C	7 min.
4 ° C	∞

* Repetição em 35 ciclos.

As concentrações dos reagentes utilizados nesta reação encontram-se descritos na tabela 4 e o protocolo de ciclagem encontra-se descrito na tabela 5. Em cada experimento foram usados controles negativos, contendo todos os componentes necessários à reação de PCR, com exceção do DNA, e controles positivos, provenientes de amostras comprovadamente positivas para a presença do HPV. Os testes dos controles positivos e negativos produziram os resultados esperados. Quando os controles não funcionavam, a reação era refeita para garantir a confiabilidade dos resultados. Após o término da PCR, os produtos foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Todas as amostras foram testadas até três vezes para confirmação dos resultados.

Tabela 3. Sequências dos primers GP5/GP6 e sua versão extendida GP5+/GP6+.

Nome do Primer	Sequência
GP5/GP6	5' -TTTGTTACTGTGGTAGATAC- 3'
	3' -ACTAAATGTCAAATAAAAAG- 5'
GP5+/GP6+	5' -TTTGTTACTGTGGTAGATAC TAC- 3'
	3' -CTTAT ACTAAATGTCAAATAAAAAG- 5'

Tabela 4: Reagentes utilizados nos três métodos de PCR analisados no estudo

<i>Reagente</i>	<i>Concentração Final</i>		
	GP5+/GP6+	MY09/11	PGMY
Primer	0,2µM	50pM	10pM
Tampão	1x	1x	1x
MgCl₂	3,5mM	2,5mM	4mM
dNTPs	200µM	200µM	200µM
Taq Pol.	1U	1U	1U
Amostra	6ng/µL	2ng/µL	1ng/µL
H₂O	q.s.p. 25µL	q.s.p. 25µL	q.s.p. 25µL
Total	25µL	25µL	25µL

Tabela 5: Protocolos de ciclagem utilizados para os três métodos de PCR presentes no estudo.

<i>Primer</i>	<i>GP5+/GP6+</i> <i>40 ciclos</i>		<i>MY09/11</i> <i>40 ciclos</i>		<i>PGMY09/11</i> <i>40 ciclos</i>	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	94 °C	4 min.	95 °C	9 min.	95 °C	9 min.
Anelamento	94 °C	1 min.	95 °C	1 min.	95 °C	1 min.
	40 °C	2 min.	50 °C	1 min.	55 °C	1 min.
	72 °C	1 min.	72 °C	1 min.	72 °C	1 min.
Extensão	72 °C	7 min.	72 °C	5 min.	72 °C	5 min.
Fim	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

IV.2.5 – Detecção do genoma viral utilizando os primers degenerados MY09/11:

O segundo método usado para a detecção do DNA do HPV nas amostras cervicais utilizou os primers degenerados MY09/MY11, cujo produto é visualizado pela presença de uma banda de aproximadamente 450 pb. A sequência dos primers MY09/11 encontra-se na tabela 6, as concentrações dos reagentes utilizados nesta reação encontram-se descritos na tabela 4, e o protocolo de ciclagem encontra-se descrito na tabela 5. Em cada experimento também foram usados controles negativos e controles positivos apropriados, sendo que todos os controles produziram os resultados esperados. Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Todas as amostras foram testadas até três vezes para confirmação dos resultados.

IV.2.6 – Detecção do Genoma viral utilizando os primers consensuais PGMY09/11:

Uma vez que o trabalho consistiu na comparação dos três principais métodos de PCR para detecção do DNA do HPV, o terceiro método empregou os primers consensuais PGMY09/11, cujo produto é visualizado pela presença de uma banda de aproximadamente 450 pb. As sequências dos primers PGMY09/11, encontram-se na tabela 7. As concentrações dos reagentes utilizados nesta reação encontram-se descritos na tabela 4, e o protocolo de ciclagem encontra-se descrito na tabela 5. Cada experimento de amplificação utilizou controles positivos e negativos para garantir a confiabilidade da reação. Os produtos da PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Todas as amostras foram testadas até três vezes para confirmação dos resultados.

Tabela 6. Sequência de alinhamento dos primers MY09/11.

Nome da sequência e tipo de HPV	Sequência (5' - 3')						
MY09	CGT	CCM	ARR	GGA	WAC	TGA	TC
HPV-6.....
HPV-11.....
HPV-16.....T
HPV-18.....T
HPV-26.....	..C	..T	..TT
HPV-31.....	..AT
HPV-33.....
HPV-35.....	..GC
HPV-39.....G	..T
HPV-40.....T	..TT
HPV-42.....	..TA	..TT
HPV-45.....	..AT
HPV-52.....	..TA	..T
HPV-53.....	..TG
HPV-55.....	..TAT
HPV-56.....	..TATT
HPV-58.....
HPV-59.....
MY11	GCM	CAG	GGW	CAT	AAV	AAT	GG
HPV-6.....
HPV-11.....	..T
HPV-16.....C	..C
HPV-18.....
HPV-26.....
HPV-31.....	..TC
HPV-33.....A
HPV-35.....S	..C
HPV-39.....C	..C
HPV-40.....C
HPV-42.....AC
HPV-45.....C
HPV-52.....	..GC	..C
HPV-53.....
HPV-55.....	..GC	..C
HPV-56.....A	..C
HPV-58.....A
HPV-59.....	..T	TTA

Tabela 7. Sequência dos primers PGMY09/11.

Nome do primer	Sequência do primer (5'-3')
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B.....	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D.....	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E.....	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F.....	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G.....	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H.....	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-I	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J.....	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L.....	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M.....	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-P	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q.....	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

IV.3 – Análise estatística dos resultados comparativos entre as metodologias

Os resultados obtidos pela detecção do DNA do HPV foram categorizados em positivos para o DNA do HPV ou negativos para o DNA do HPV, para cada teste realizado. Nesse estudo a análise estatística comparativa foi feita pelo teste kappa (k) ponderado, para avaliar a proporção de concordância entre os métodos além da chance esperada pelo acaso (Castle *et al.*, 2002; Fontaine *et al.*, 2007). A concordância medida pelo kappa seguiu a orientação da literatura especializada: kappa =0 pobre; de 0 a 0.20 ligeira; de 0.21 a 0.4 considerável; de 0.41 a 0.6 moderada; de 0,61 a 0,8 substancial e de 0.81 a 1 excelente (McNabb, 2004). Porém, cabe destacar que, em geral, recomenda-se maior ênfase ao valor numérico propriamente, uma vez que tais escalas podem variar entre os autores. O teste Q de Cochran foi o teste não-paramétrico de escolha para avaliar a diferença entre as três amostras relacionadas (McNabb, 2004). Este teste foi escolhido pois permite investigar quando um conjunto de “n” (sendo que “n” deve ser maior ou igual a três) proporções relacionadas difere significativamente, utilizando dados nominais. As análises foram feitas através do programa SPSS 11.0 *for Windows*.

V- Resultados

V.1- GRUPO AMOSTRAL

Para esse trabalho foram selecionadas 60 pacientes HIV-positivas e 60 pacientes HIV-negativas, que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento. As pacientes passaram por uma entrevista visando esclarecimentos sobre a pesquisa e preenchimento de ficha contendo dados sócio-demográficos e comportamentais. Após os esclarecimentos, as pacientes foram encaminhadas para coleta citológica, com coleta de material endocervical para ser testado por biologia molecular e a confecção de lâmina para posterior citologia. Todas as pacientes que fizeram a coleta ginecológica foram incluídas no estudo, resultando num total de 120 amostras cérvico-vaginais (60 HIV-positivas e 60 HIV-negativas).

As amostras coletadas foram então submetidas à extração de DNA, conforme descrito anteriormente. O material proveniente da extração foi testado para um fragmento do gene GAPDH, considerado um gene constitutivo humano. Após várias tentativas de extração, apenas 57 amostras do grupo das pacientes HIV-positivas e 57 amostras do grupo das pacientes HIV-negativas tiveram amplificação do fragmento de aproximadamente 90pb do gene GAPDH. Assim, seis amostras (3 HIV-positivas e 3 HIV-negativas) foram excluídas do estudo por falta de material suficiente para análise, reduzindo para 114 o grupo amostral. Por se tratar de uma técnica sensível, alguns fatores externos podem ter influenciado os resultados da PCR, a saber: baixa quantidade de células presentes no material analisado, o método de extração de DNA utilizado, amplificação inespecífica, possíveis inibidores da reação de PCR (Gravitt *et al.*, 2000), degradação do DNA, o meio de coleta do material, uma vez que alguns estudos mostraram que espécimes coletados em determinados meios líquidos apresentam um maior nível de detecção inespecífica do que amostras coletadas em outros meios (Dehn *et al.*, 2006), entre outras, explicando a falha na extração das 6 amostras excluídas do trabalho e, conseqüente falta de amplificação pela PCR.

V.2 – EPIDEMIOLOGIA

Foram analisadas 114 amostras cervicais, provenientes de 57 pacientes HIV-positivas e 57 pacientes HIV-negativas. As características sócio-demográficas e comportamentais do grupo amostral encontram-se descritas na tabela 8. A média de idade das pacientes foi de 38 anos (intervalo entre 18 e 68 anos). Uma vez que a progressão das lesões por HPV para câncer uterino depende de alguns outros fatores, como paridade, idade à primeira relação sexual e número de parceiros, esses dados também foram analisados.

Tabela 8 - Características sócio-demográficas e comportamentais das mulheres HIV-positivas e HIV-negativas estudadas

Variável	N	%
Média de Idade	38 anos (18 - 68)	
Estado Civil		
Solteira	50	43,9
Casada	36	31,6
Outros	28	24,6
Renda Familiar		
menor que 1 salário	79	69,3
1 a 3 salários	30	26,3
acima de 3 salários	5	4,4
Escolaridade		
Ensino fundamental incompleto	58	50,9
Ensino fundamental completo	11	9,6
Ensino médio completo ou acima	45	39,5
não informado	0	0,0
Paridade	2 (0 - 10)	
1ª relação sexual	17 (12 - 31)	
N. de parceiros		
1 a 3	59	51,75
4 a 10	42	36,84
mais de 10	13	11,40
História de prostituição		
Sim	11	9,65
Não	103	90,35
Tabagismo		
Sim	29	25,44
Não	85	74,56
Etilismo		
Sim	33	28,95
Não	81	71,05

As pacientes envolvidas no estudo mostraram uma média de duas gestações, com intervalo entre zero a 10 filhos, sendo que a idade média à primeira relação sexual foi de 17 anos, variando entre 12 e 31 anos.

V.3- CITOLOGIA ONCÓTICA CERVICAL

Todas as mulheres participantes do estudo passaram por inspeção cervical com coleta de material citológico para realização do teste de *Papanicolaou*, para verificação de possíveis lesões cervicais. Dentre as 57 amostras obtidas de mulheres HIV-positivas, 17 (30%) apresentaram algum tipo de alteração citológica cervical, a saber, cinco amostras com ASC-US, seis com lesões de grau 1 e seis com lesões de grau 2/3. A detecção do genoma do HPV pelo método de PCR revelou a presença do vírus em 94% (16/17) das amostras com alterações citológicas, sendo esta detecção observada com pelo menos uma das metodologias de PCR empregadas (tabela 9).

Dentre as cinco amostras diagnosticadas com ASC-US, uma delas não apresentou o genoma do HPV com nenhuma das metodologias utilizadas. Assim, apenas 5% das amostras diagnosticadas com alterações citológicas não apresentaram o genoma do HPV, utilizando o método da PCR. Por outro lado, 55% (26/57) das amostras obtidas das mulheres HIV-positivas apresentaram o genoma do HPV detectado pelos testes de PCR, mas não apresentaram nenhuma alteração citológica pelo teste de *Papanicolaou*.

Dentre as amostras obtidas de mulheres HIV-negativas, três (5%) apresentaram anormalidades citológicas cervicais, a saber, duas amostras com ASC-US e uma com lesão de grau 2/3. Neste grupo de amostras obtidas de mulheres HIV-negativas, 66% (2/3) apresentaram o genoma do HPV detectado por pelo menos uma das metodologias de PCR empregadas (Tabela 10). Dentre as três amostras com alterações citológicas, uma delas (33%), portadora de ASC-US, teve o DNA do HPV detectado apenas com a utilização dos primers GP5+/GP6+. A amostra diagnosticada com lesão de grau 2/3 teve o DNA do HPV detectado com os três métodos de PCR utilizados e uma das amostras diagnosticada com ASC-US não teve o DNA viral detectado por nenhuma das metodologias.

Tabela 9: Comparação entre citologia e detecção de HPV nas pacientes HIV-positivas, com os três conjuntos de primers utilizados.

Resultados da Citologia	Detecção de HPV					
	GP5+/GP6+		MY09/11		PGMY09/11	
	+	-	+	-	+	-
Normal	15	25	23	17	25	15
ASC-US	2	3	2	3	4	1
NIC –I	4	2	4	2	6	0
NIC II/III	6	0	6	0	6	0
Total	27	30	35	22	41	16

Tabela 10: Comparação entre citologia e detecção de HPV nas pacientes HIV-negativas, com os três conjuntos de primers utilizados.

Resultados da citologia	Detecção de HPV					
	GP5+/GP6+		MY09/11		PGMY09/11	
	+	-	+	-	+	-
Normal	13	41	16	38	20	34
ASC-US	1	1	1	1	1	1
NIC –I	0	0	0	0	0	0
NIC II/III	1	0	0	1	0	1
Total	15	42	17	40	21	36

V.4 – DETECÇÃO DO GENOMA DO HPV NAS AMOSTRAS CERVICAIS UTILIZANDO OS PRIMERS GP5+/GP6+, MY09/11, PGMY09/11:

Utilizando os primers GP5+/GP6+, nosso estudo demonstrou o genoma do HPV em 27/57 (47,3%) das amostras provenientes das pacientes HIV-positivas e em 15/57 (26,3%) das amostras das pacientes HIV-negativas. A figura 8 mostra os resultados das reações de PCR usadas na detecção do genoma viral, utilizando os primers GP5+/GP6+.

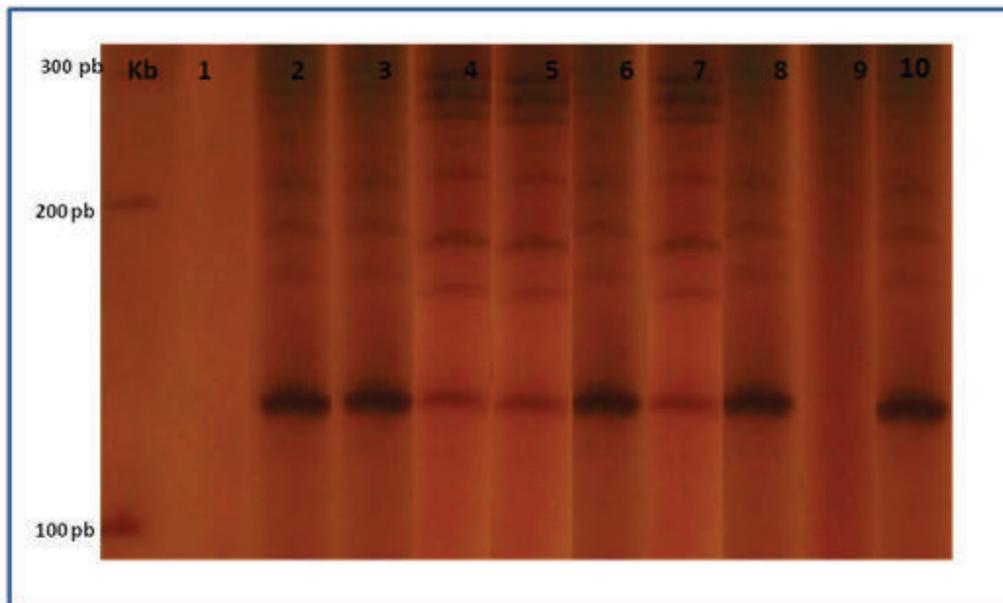


Figura 8– Gel de poliacrilamida, corado por nitrato de prata. Visualização da banda de aproximadamente 150pb proveniente da amplificação do DNA do HPV pelo método de PCR utilizando os primers GP5+/GP6+. Em 1, temos controle negativo; em 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8: amostras positivas para o DNA do HPV; em 9: amostra negativa para o DNA do HPV e em 10: controle positivo para o DNA do HPV.

Os primers designados MY09/11 compreendem uma mistura de 24 sequências únicas de nucleotídeos, capazes de detectar em torno de 30 tipos genitais de HPV, com níveis variados de sensibilidade. Nosso estudo demonstrou o genoma do HPV, utilizando os primers MY09/11, em 35/57 (61,4%) das amostras das pacientes HIV-positivas e em 17/57 (29,8%) das amostras obtidas das pacientes HIV-negativas. Os resultados das reações de PCR utilizando os primers MY09/11 estão representados na figura 9.

Utilizando os primers PGMY09/11, nosso estudo detectou o genoma do HPV em 41/57 (71,9%) das amostras provenientes das pacientes HIV-positivas e em 21/57 (36,8%) das amostras das pacientes HIV-negativas. A figura 10 mostra os resultados das reações de PCR usadas na detecção do genoma viral.

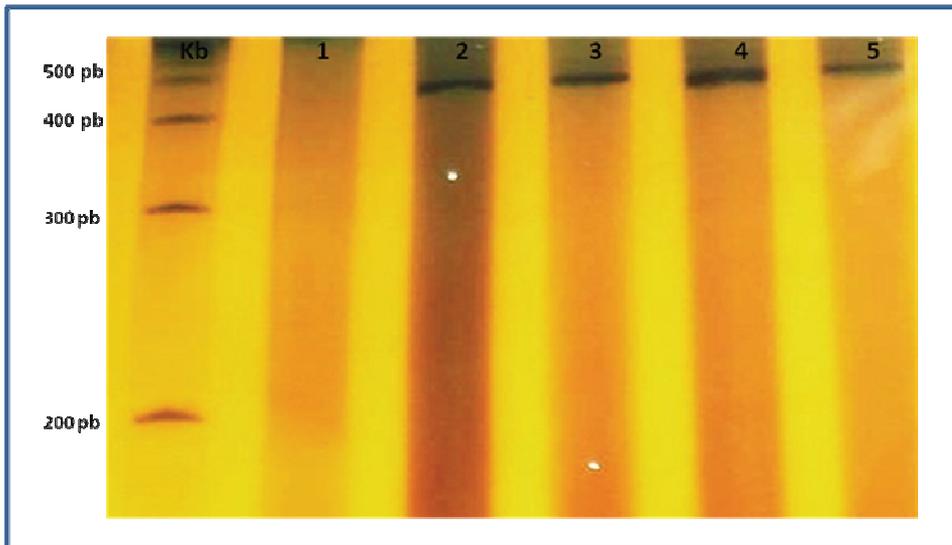


Figura 9 – Gel de poliacrilamida 8%, corado por nitrato de prata. Visualização da banda de aproximadamente 450pb proveniente da amplificação do DNA do HPV por PCR utilizando os primers MY09/11. Em 1: controle negativo para o DNA do HPV; em 2; 3 e 4: amostras positivas para o DNA do HPV e em 6: controle positivo para o DNA do HPV.

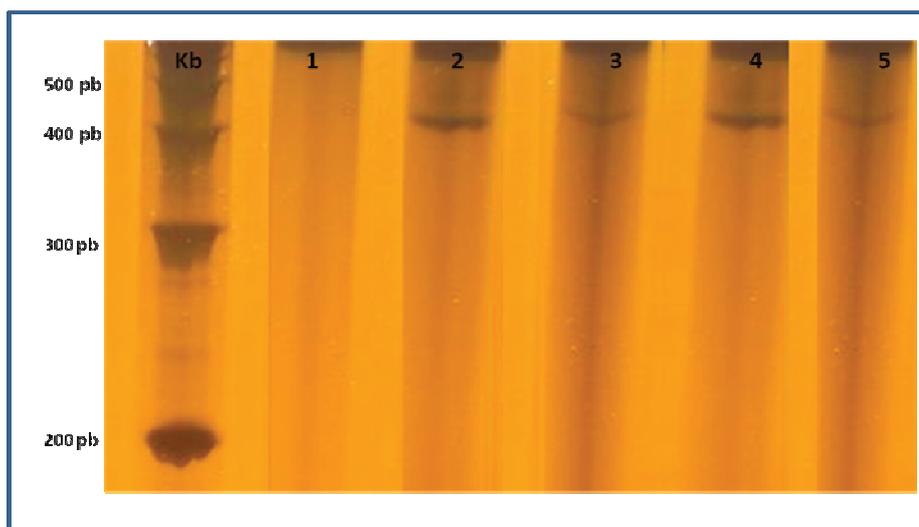


Figura 10 –Gel de poliacrilamida 8%, corado por nitrato de prata. Visualização da banda de aproximadamente 450pb proveniente da amplificação do DNA do HPV por PCR utilizando os primers PGMY09/11. Em 1: controle positivo para o DNA do HPV; em 2; 3; 4: amostras positivas para o DNA do HPV e em 5: controle positivo para o DNA do HPV.

V.5 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DETECÇÃO DO DNA DO HPV UTILIZANDO OS PRIMERS GP5+/GP6+, MY09/11 E PGMY09/11 PARA O GRUPO DAS PACIENTES HIV-POSITIVAS E HIV-NEGATIVAS.

Um resumo geral dos resultados obtidos pela comparação entre as três metodologias para o grupo das pacientes HIV-positivas é apresentado na tabela 11. As 57 amostras obtidas das pacientes HIV-positivas foram avaliadas

para a presença do DNA do HPV com uso dos três métodos. A detecção de HPV com o sistema PGMY09/11 apresentou maior prevalência do genoma viral quando comparada com MY09/11 e com GP5+/GP6+ (71.9%, 61.4% e 47.3%, respectivamente). Dentre as 57 amostras analisadas, 38 (67%) apresentaram concordância entre os três métodos, sendo que 24 (24/38 = 63%) delas apresentaram resultados positivos para o HPV e 14 (14/38 = 37%) foram negativas para o HPV. Dentre as 19 amostras (33,3%) com resultados discordantes para as metodologias, 12 foram positivas por duas metodologias (9 por MY09/11 e PGMY09/11 e 3 por GP5+/GP6+ e PGMY) e 7 (7/19 = 37%) foram positivas por apenas uma das metodologias (5 por PGMY09/11 e 2 por MY09/11).

Para avaliar se a concordância entre as metodologias foi significativa, usando os três conjuntos de primers, fizemos a opção pelo uso do teste Q de Cochran, usado para amostras relacionadas para testar a diferença entre três ou mais grupos de frequências ou proporções. Esse teste é considerado uma extensão do teste de McNemar, muito citado em estudos semelhantes aos nossos, mas que comparam até dois métodos (Gravitt et al., 2000). O valor obtido no teste de Cochran (Q: 15,57 e p: 0,0004) mostrou que no grupo das pacientes HIV-positivas, houve diferença estatística significativa entre os resultados dependendo do tipo de primer utilizado.

Tabela 11. Frequência das categorias por metodologias: pacientes HIV-positivas.

Categorias	Metodologia		
	GP5+/GP6+	MY09/11	PGMY09/11
HPV +	27 (47%)	35 (61%)	41 (72%)
HPV -	30 (52%)	22 (38%)	16 (28%)
Total	57	57	57

Percentual de Concordância = 67%; Cochran = 15,57 (P= 0,0004)

Os resultados obtidos pela comparação entre as três metodologias para o grupo das pacientes HIV-negativas é apresentado na tabela 12. As 57 amostras obtidas das pacientes HIV-negativas foram avaliadas para a presença do DNA do HPV através dos três métodos. A detecção de HPV com o sistema PGMY09/11 apresentou maior prevalência do genoma viral quando comparado com MY09/11 e deste com GP5+/GP6+ (37%, 30% e 26%, respectivamente). Dentre as 57 amostras analisadas, 42 (73%) apresentaram concordância entre os três métodos, sendo que 11 (11/42 = 26%) delas apresentaram resultados positivos para o HPV e 31 (31/42 = 74%) foram negativas para o HPV. Dentre as 15 (28%) amostras com resultados discordantes para as metodologias, 5 foram positivas por duas metodologias (3 por MY09/11 e PGMY09/11 e 2 por GP5+/GP6+ e PGMY) e 10 (10/15 = 67%) foram positivas por apenas uma das metodologias (5 por PGMY09/11, 3 por MY09/11 e 2 por GP5+/GP6+).

Para avaliar se a concordância entre as metodologias foi significativa, o teste Q de Cochran também foi utilizado (Q: 3,73 e P = 0,154) e mostrou que no grupo das pacientes HIV-negativas não houve diferença estatística significativa para a detecção do genoma viral dependendo do tipo de primer utilizado.

Tabela 12. Frequência das categorias por metodologias: pacientes HIV-negativas.

Categorias	Metodologia		
	GP5+/GP6+	MY09/11	PGMY09/11
HPV +	15 (26%)	17 (30%)	21 (36)
HPV –	42 (73%)	40 (70%)	36 (63%)
Total	57	57	57

Percentual de Concordância = 73%; Cochran = 3,73 (P = 0,154)

V.6 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DETECÇÃO DO DNA DO HPV ENTRE OS DOIS GRUPOS DE PACIENTES.

Quando os dois grupos de pacientes (HIV-positivas e o grupo controle) foram analisados utilizando os primers genéricos GP5+/GP6+, o DNA do HPV foi encontrado em 27/57 (47%) amostras HIV-positivas e em 15/57 (26%) amostras HIV-negativas. Assim, utilizando-se os primers GP5+/GP6+ o índice de detecção foi maior no grupo das HIV-positivas. Utilizando-se os primers MY09/11, a detecção para o grupo das pacientes HIV-positivas foi de 35 (61%) amostras, já no grupo das pacientes HIV-negativas, a detecção caiu para 17 (29%) amostras, sendo que para esse conjunto de primers, o índice de detecção também foi maior para o grupo das pacientes HIV-positivas. Com o terceiro grupo de primers, PGMY09/11, a diferença entre os dois grupos foi ainda mais acentuada, com 41/57 (72%) amostras detectadas no grupo das pacientes HIV-positivas e apenas 21/57 (37%) amostras no grupo das pacientes HIV-negativas (Tabela 13). Observando-se o total geral de detecção, desconsiderando-se o tipo de método utilizado, o total de detecção do genoma do HPV para o grupo das HIV-positivas foi de 75% (43/57), enquanto o grupo das pacientes HIV-negativas apresentou 45% (26/57) de detecção do DNA do HPV.

Tabela 13. Tabela descritiva da detecção do DNA do HPV utilizando-se as três metodologias de PCR abordadas no estudo entre os dois grupos de pacientes.

Método	HIV + (n=57)		HIV- (n=57)	
	HPV+	HPV-	HPV+	HPV-
GP5+/GP6+	27 (47%)	30 (52%)	15 (26%)	42 (73%)
MY09/11	35 (61%)	22 (38%)	17 (30%)	40 (70%)
PGMY09/11	41 (72%)	16 (28%)	21 (37%)	36 (63%)
Indiferente	43 (75%)	14 (25%)	26 (45%)	31 (55%)

V.7 – COMPARAÇÃO DOS PRIMERS GP5+/GP6+ e MY09/11; GP5+/GP6+ e PGMY09/11 e MY09/11 e PGMY09/11 PARA DETECÇÃO DO HPV EM PACIENTES HIV-POSITIVAS.

A comparação dos resultados da detecção do DNA do HPV com as três metodologias e seu significado estatístico foi realizada com o uso do teste Q. A avaliação da concordância entre os diferentes sistemas de primers (dois observadores diferentes de um mesmo evento) utilizou o índice kappa, reunindo as metodologias duas a duas. Quando comparados os resultados da detecção do DNA do HPV com os conjuntos de primers GP5+/GP6+ e MY09/11, percebeu-se um aumento na detecção do genoma viral com a utilização dos primers MY09/11 em relação ao primer GP5+/GP6+ (61% e 47%, respectivamente), resultando num percentual de concordância de 75,4% entre os dois métodos. O cálculo do índice kappa (k) para verificar a associação entre os dois métodos (Tabela 14) revelou uma concordância moderada (k = 0,51; p = 0,000).

Tabela 14. Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.

GP5+/GP6+	MY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	19	11	30
HPV+	3	24	27
Total	22	35	57

Percentual de concordância: 75,4% Kappa: 0,51 (p=0,000)

A comparação dos resultados da detecção do HPV com os primers GP5+/GP6+ e PGMY09/11, cujo percentual geral de concordância foi de 75,4%, revelou uma maior prevalência (47% e 72%, respectivamente) com o emprego dos primers PGMY09/11 (Tabela 15). O cálculo do índice kappa para verificar a concordância entre esses dois métodos revelou uma associação moderada entre os primers (k= 0,52 e p = 0,000).

Tabela 15. Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e PMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.

GP5+/GP6+	PGMY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	16	14	30
HPV+	0	27	27
Total	16	41	57

Percentual de Concordância: 75,4 Kappa: 0,52 (p=0,000)

Por último, a análise da concordância entre os primers MY09/11 e PGMY09/11(82,4%), revelou os índices de detecção (61% e 72%) mais elevados dentre os três conjuntos de primers, porém mostrando maior prevalência quando a detecção do DNA do HPV foi realizada com os primers PGMY09/11. Calculando o índice kappa ($k = 0,61$ e $p = 0,000$), verificou-se uma associação substancial entre esses dois métodos (Tabela 16).

Tabela 16. Concordância geral entre os primers MY09/11 e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-positivas.

MY09/11	PGMY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	14	8	22
HPV+	2	33	35
Total	16	41	57

Percentual de Concordância: 82,4% Kappa: 0,61 (p=0,000)

V.8 – COMPARAÇÃO DOS PRIMERS GP5+/GP6+ e MY09/11; GP5+/GP6+ e PGMY09/11 e MY09/11 e PGMY09/11 PARA DETECÇÃO DO HPV EM PACIENTES HIV-NEGATIVAS.

A comparação entre os resultados da detecção do DNA do HPV com todas as metodologias e a avaliação de seu significado estatístico foram realizadas com o uso do teste Q de Cochrane ($Q = 3,73$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para as três metodologias empregadas na análise das amostras obtidas de pacientes HIV-negativas. Para a avaliação da concordância entre os primers, utilizando o índice kappa, as metodologias foram reunidas duas a duas. Quando comparados os resultados

da detecção do DNA do HPV entre os conjuntos de primers GP5+/GP6+ e MY09/11, observou-se um aumento na detecção com uso dos primers MY09/11 em relação aos primers GP5+/GP6+ (30% e 26%, respectivamente), com uma concordância geral de 82%. Quando o índice kappa (k) foi calculado para verificar a associação entre os dois métodos (Tabela 17) verificou-se uma concordância moderada ($k = 0,57$; $p = 0,000$) entre os mesmos.

Tabela 17. Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.

GP5+/GP6+	MY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	36	6	42
HPV+	4	11	15
Total	40	17	57

Percentual de Concordância: 82% Kappa: 0,57 ($p=0,000$)

A comparação dos resultados da detecção do HPV com uso dos primers GP5+/GP6+ e PGMY09/11, revelou uma maior prevalência (26% e 37%, respectivamente) com o uso dos primers PGMY09/11 (Tabela 18). O percentual geral de concordância entre os dois métodos foi de 82,4%. O cálculo do índice kappa para verificar a associação entre esses dois métodos revelou uma associação moderada entre os primers ($k= 0,60$ e $p = 0,000$). Finalmente, a concordância entre os primers MY09/11 e PGMY09/11 (82,4%), demonstrou os índices (30% e 37%) mais elevados entre os três conjuntos de primers, porém mostrando maior prevalência quando a detecção do DNA do HPV foi realizada com os primers PGMY09/11. Calculando o índice kappa ($k = 0,61$ e $p = 0,000$) verificou-se uma associação substancial entre esses dois métodos (Tabela 19), assim como no grupo das pacientes HIV-positivas.

Tabela 18. Concordância geral entre os primers GP5+/GP6+ e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.

GP5+/GP6+	PGMY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	34	8	42
HPV+	2	13	15
Total	36	21	57

Percentual de Concordância: 82,4% Kappa: 0,60 ($p=0,000$)

Tabela 19. Concordância geral entre os primers MY09/11 e PGMY09/11 para o grupo das pacientes HIV-negativas.

MY09/11	PGMY09/11		
	HPV-	HPV+	Total
HPV-	33	7	40
HPV+	3	14	17
Total	36	21	57

Percentual de Concordância: 82,4% Kappa: 0,61 ($p=0,000$)

VI - Discussão

A infecção por tipos de HPV de alto risco, apesar de ser um fator necessário (Bosch *et al.*, 2006; Vaccarella *et al.*, 2006; Tiro *et al.*, 2007), não é suficiente para o desenvolvimento de câncer cervical (Gómez & Santos, 2007), e depende de uma gama de fatores adicionais agindo em consonância com os diferentes genótipos virais considerados de alto risco. A prevalência do DNA do HPV em espécimes cervicais varia consideravelmente de acordo com o sujeito do estudo e os testes usados para a detecção do genoma viral. Os determinantes para a infecção pelo HPV em mulheres incluem o número de parceiros sexuais, o ano em que a mulher iniciou sua vida sexual, os hábitos sexuais de seu parceiro, que pode ser o portador (Bosch *et al.*, 2006), e de outros fatores comportamentais, tais como fumo, etilismo e co-infecção pelo HIV. As pacientes que aceitaram participar deste estudo passaram por uma entrevista para, além de esclarecimentos sobre o método usado no estudo e coletas de dados epidemiológicos e comportamentais como paridade, idade à primeira relação sexual, número de parceiros, uso de drogas ilícitas, etilismo, tabagismo, dentre outros (Anexo 2).

Os dados epidemiológicos foram tabulados (Tabela 8) e analisados juntamente com a detecção do DNA do HPV para os dois grupos de pacientes. Nossos resultados mostraram que no grupo das pacientes HIV-positivas, a idade variou entre 18 e 68 anos, com idade média de 38 anos, compreendendo mulheres em plena atividade sexual. A idade à primeira relação sexual foi, em média 17 anos (intervalo entre 12 e 31), mostrando um início precoce das atividades sexuais, o que pode ser um fator de risco para a infecção pelo HPV, principalmente se relacionado a um alto número de parceiros sexuais. No presente estudo, encontramos 13 mulheres que relataram mais de 10 parceiros; 42 mulheres com 4 a 10 parceiros e 59 mulheres com um a três parceiros. Analisando separadamente esses dados, entre as 57 pacientes HIV-positivas, 11 delas relataram ter tido mais de 10 parceiros durante sua vida sexual, contra apenas duas mulheres no grupo das HIV-negativas. Quanto à paridade, a média entre os dois grupos se assemelha, com 2,0 filhos em média por paciente HIV-negativa e 2,5 filhos, em média, para cada paciente HIV-

positiva. O intervalo de idade à primeira relação sexual é de 12 a 22 anos para o grupo das pacientes HIV-positivas e de 13 a 31 anos para as pacientes HIV-negativas. Assim, mesmo que de uma forma discreta, as pacientes inseridas no grupo positivo para o HIV estão mais expostas aos fatores de risco para a infecção pelo HPV e o câncer de colo de útero. Além disso, a própria condição imunológica da paciente HIV-positiva já é por si só, um grande fator de risco para a progressão à malignidade das lesões cervicais. Nossos resultados gerais de detecção do DNA do HPV apóiam esses dados, uma vez que o índice geral de detecção do genoma do HPV no grupo das pacientes HIV-positivas foi de 75% e das pacientes HIV-negativas foi de 45%.

Juntamente com os dados sócio-demográficos e comportamentais, as pacientes passaram por um exame citológico da cérvix uterina, com coleta da material para análise citológica pelo método de *Papanicolaou*. Comparando-se os dados da citologia com os dados da detecção do DNA do HPV pelas três metodologias, no grupo das pacientes HIV-positivas, apenas uma das 17 mulheres diagnosticadas com alterações citológicas cervicais não foi identificada pelo método da PCR. Por outro lado, dentre as 43 pacientes detectadas como HPV-positivas pelo método de PCR, 63% (26/43) não apresentaram anormalidades citológicas pelo teste de *Papanicolaou*. No grupo das pacientes HIV-negativas, apenas três mulheres foram diagnosticadas com alterações citológicas. Dentre essas mulheres, uma não foi identificada por nenhum dos métodos de PCR utilizados no estudo. Por outro lado, dentre as 26 pacientes positivas para o HPV pelo método de PCR, 88% (23/26) não apresentaram anormalidades citológicas detectadas pelo teste de *Papanicolaou*.

Duas pacientes diagnosticadas com ASC-US (uma do grupo das pacientes HIV-positivas e uma do grupo das pacientes HIV-negativas) não tiveram o genoma viral detectado pelo teste de biologia molecular. Alterações citológicas de significado indeterminado podem ser encontradas por consequência de quadro inflamatório moderado e irritações da cérvix (uso de tampões vaginais, relações sexuais recentes, entre outros), o que faz com que as células possam ter aparência anormal, mas não anormal o suficiente para significarem sinais de câncer ou mesmo da presença de infecção por HPV de tipos oncogênicos. Mulheres diagnosticadas com ASC-US podem ou não ser

positivas para a presença de HPV e, para cada um dos casos, medidas diferentes devem ser tomadas (Russomano *et al.*, 2008). Testes moleculares para detecção do HPV apresentam algumas vantagens como testes de triagem comparados à citologia e à inspeção visual da cérvix. A primeira vantagem é a maior sensibilidade, o que é importante nos casos em que a mulher será avaliada uma ou duas vezes na vida. A segunda é que o teste molecular não só identifica mulheres com doenças cervicais, como também aquelas que estão em risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical pelos próximos 3 a 10 anos. A vantagem final está no fato de que a interpretação do resultado é objetiva e não está sujeita a métodos visuais, nem à subjetividade do responsável pela realização do exame (Villa & Denny, 2006).

Os testes moleculares para detecção do HPV podem ser usados em uma grande variedade clínica, incluindo triagem primária de mulheres com mais de 30 anos, como um auxiliar para os testes citológicos, na triagem de mulheres cujos resultados citológicos foram equivocados ou ainda no tratamento pós- câncer cervical (Bhatla & Moda, 2009). O entendimento da importância da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer cervical tem sido acompanhado por um número crescente de estudos que tentam alertar para a importância na melhoria dos testes moleculares de detecção do HPV. Estes testes para detecção do DNA do HPV requerem o desenvolvimento de um método sensível, específico e cujo custo não impeça sua utilização em massa.

O objetivo maior do nosso estudo foi avaliar três metodologias baseadas em PCR comumente utilizadas em laboratórios de pesquisa para a detecção dos diferentes genótipos de HPV. A escolha das três metodologias foi baseada na quantidade crescente de trabalhos e estudos envolvendo a detecção do HPV por esse tipo de técnica (tabela 20). Para que um teste seja validado e seu uso possa passar dos laboratórios de pesquisa para a clínica médica ele precisa ser testado exaustivamente e sua eficiência precisa ser comprovada. Com os estudos atuais sabemos que, mesmo o teste de Captura Híbrida sendo o único aprovado pela FDA, ele possui algumas desvantagens na detecção do DNA do HPV. Esta metodologia mesmo sendo capaz de detectar 13 tipos de HPVs de alto risco não é, por exemplo, capaz de distinguir se as amostras pesquisadas contêm um único tipo ou múltiplos tipos de HPV, fato que é

conhecidamente comprovado como sendo um dos fatores de risco para persistência da lesão desencadeada pelo HPV e sua provável transformação em lesões de alto grau e câncer cervical. Os primers consensuais desenhados a partir da região L1 do HPV têm sido mundialmente usados para o estudo da história natural do HPV e seu papel no desenvolvimento do câncer genital, particularmente, da cérvix uterina. As metodologias envolvendo os primers consensuais (GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11) foram utilizadas e avaliadas em um grande número de estudos importantes e que foram capazes de mostrar o risco da infecção pelo HPV e sua associação com o câncer cervical (Gravitt *et al.*, 2000).

Para verificar os resultados obtidos com a detecção do DNA do HPV por metodologias distintas, conduzimos uma comparação paralela entre três sistemas de detecção por PCR: GP5+/GP6+, MY09/11 e PGMY09/11. Das 120 amostras cervicais coletadas (60 HIV-positivas e 60 HIV-negativas), um total de 6 amostras (três HIV-positivas e três HIV-negativas) foram excluídas do estudo por não apresentarem positividade quando testadas por PCR usando primers específicos para o gene constitutivo GAPDH, indicando ausência de DNA compatível com a reação de PCR envolvendo os primers utilizados. As três amostras HIV-positivas e as três HIV-negativas que não apresentaram DNA foram re-extraídas e novamente testadas para GAPDH. Como não obtivemos resultado positivo tentamos a re-extração de DNA por uma técnica caseira à base de fenol-clorofórmio. Como não encontramos positividade, as amostras foram excluídas do trabalho. Alguns fatores podem ter contribuído para a não obtenção de material satisfatório dessas amostras, incluindo a degradação e/ou contaminação do DNA, a insuficiência de material coletado, presença de inibidores da reação de PCR, problemas na conservação do material ou devido à baixa sensibilidade da técnica de extração utilizada. Assim, 57 amostras HIV-positivas e 57 amostras HIV-negativas foram analisadas no estudo e testadas pelos três conjuntos de primers para detecção do genoma do HPV pela técnica da PCR.

A porcentagem geral de concordância entre os três métodos para o grupo das HIV-positivas foi de 75% (Q = 15,57 e p = 0,0004). Houve um aumento na detecção de HPV com o sistema PGMY09/11, quando comparado com MY09/11, e deste com GP5+/GP6+ (72%, 61% e 47%, respectivamente).

Entre as 57 amostras, 38 (67%) apresentaram concordância entre os três métodos, sendo que 24 ($24/38 = 63\%$) delas apresentaram resultados positivos para o HPV e 14 ($14/38 = 37\%$) foram negativas para o HPV. Das 19 (33,3%) amostras discordantes entre as metodologias, todas foram positivas para o HPV por, no mínimo, uma metodologia, a saber, 12 ($12/19 = 63\%$) foram positivas por duas metodologias (9 por MY09/11 e PGMY09/11 e 3 por GP5+/GP6+ e PGMY) e 7 ($7/19 = 37\%$) foram positivas por apenas uma das metodologias (5 por PGMY09/11 e 2 por MY09/11).

Entre o grupo das pacientes HIV-negativas, a porcentagem geral de concordância entre os três métodos foi de 45% ($Q = 3,73$ e $P = 0,154$). Mesmo observando que a porcentagem de concordância geral para esse grupo foi menor, também houve um aumento na detecção do HPV com o sistema PGMY09/11 quando comparado com MY09/11 e deste com GP5+/GP6+ (37%, 30% e 26%, respectivamente). Dentre as 57 amostras, 42 (74%) apresentaram concordância entre os três métodos avaliados, sendo que 11 ($11/42 = 26\%$) delas apresentaram resultados positivos para o HPV e 31 ($31/42 = 74\%$) foram negativas para o HPV. Das 15 amostras discordantes entre as metodologias, todas foram positivas para o HPV por, no mínimo, uma metodologia, a saber, 5 ($5/15 = 33\%$) foram positivas por duas metodologias (3 por MY09/11 e PGMY09/11 e 2 por GP5+/GP6+ e PGMY09/11) e 10 ($10/15 = 67\%$) foram positivas por uma metodologia apenas (2 por GP5+/GP6+, 3 por MY09/11 e 5 por PGMY09/11).

O sistema de primers consensuais PGMY09/11, no grupo das pacientes HIV-positivas, conseguiu detectar em nosso estudo 6 (10%) amostras a mais quando comparado com o sistema MY09/11 e 14 (24%) amostras a mais quando comparado ao sistema GP5+/GP6+. Em um de seus estudos, Villa e col. apresentam um resumo acerca das metodologias usadas para detecção do HPV e afirmam que nas comparações preliminares do sistema PGMY09/11 com o sistema MY09/11, em geral, existe uma concordância de 91.5% entre os dois sistemas. Entretanto, o sistema PGMY09/11 capta significativamente mais resultados HPV positivos (Iftner & Villa, 2003).

Gravitt e col., 2000, conduziram uma comparação paralela entre os sistemas MY09/11 e PGMY09/11 em 262 amostras cervicais. A porcentagem geral de concordância entre os dois métodos foi de 91,5%, com um valor de

kappa de 0.83, indicando excelente concordância entre os métodos. Porém, houve um aumento na prevalência geral de HPV com o sistema PGMY09/11 relativo ao MY09/11 (62,8% e 55.1%). O estudo de Gravitt aponta que o sistema MY09/11 foi melhorado tanto em termos de eliminação das bases degeneradas quanto em funcionalidade, mostrada pelo aumento da sua sensibilidade. Cada oligonucleotídeo compreendido no pool do PGMY09/11 é sintetizado independentemente, sendo possível uma verificação da sequência de cada primer. A sensibilidade da amplificação tipo-específica, particularmente por amostras infectadas por múltiplos tipos de HPV, também aumentou substancialmente. Gravitt *et al.*, afirma ainda que o grau do efeito com os primers PGMY09/11 é proporcional à quantidade de vírus na amostra. Esses dados também são concordantes com nosso estudo, uma vez que mesmo a associação entre os dois conjuntos de primers ter sido substancial ($k = 0.61$), o sistema PGMY09/11 também foi capaz de detectar mais amostras positivas para o DNA do HPV nos dois grupos de pacientes. No grupo das pacientes HIV-positivas a detecção foi ainda maior, fato provavelmente explicado pela presença de múltiplos tipos de HPV nas amostras de pacientes soropositivas, em relação às pacientes HIV-negativas.

Já no estudo de Freitas, 2007, é feita uma comparação entre os primers GP5+/GP6+ e os primers MY09/11, sendo que a maior taxa de detecção foi observada quando os primers GP5+/GP6+ foram utilizados. Freitas afirma que quando se faz o uso de mais de um tipo de primers consensuais, há um aumento na taxa de detecção do HPV em amostras cervicais, sendo provável que a amplificação de um fragmento genômico menor obtido pelos primers GP5+/GP6+ (150 pb) possa ser mais eficiente quando comparado com o fragmento consideravelmente maior amplificado pelos primers MY09/11 (450 pb), melhorando a sensibilidade (Freitas, 2007) e explicando o resultado obtido nesse trabalho. Nossos resultados discordam desse trabalho, uma vez que o índice de detecção entre os primers GP5+/GP6+ foi menor do que o detectado pelos primers MY09/11 para os dois grupos de pacientes (um total de 42 amostras HPV positivas pelos primers GP5+/GP6+ e 52 amostras por MY09/11). Uma provável explicação para esse fato seria a boa qualidade do DNA obtido pela extração. Se o DNA não é degradado, o tamanho do

fragmento amplificado não influencia no momento da reação de PCR, permitindo melhor detecção pelo sistema MY09/11.

Nos estudos desenvolvidos por Qu e col. 1997, a comparação feita entre os primers GP5+/GP6+ e os primers MY09/11 em um grupo de amostras cervico-vaginais obtidas de mulheres diversas, mostrou falha na detecção de múltiplos tipos de HPV pelo sistema GP5+/GP6+ em aproximadamente metade das amostras detectadas por MY09/11, também discordando do trabalho de Freitas, 2007. Para Qu e col., a prevalência geral do DNA do HPV em qualquer grupo de amostras clínicas é subestimada se apenas um método de detecção é usado (Karlsen *et al.*, 1996), uma vez que os dois tipos de primers utilizados não detectam igualmente todos os tipos de HPV. Tanto MY09/11 quanto GP5+/GP6+ amplificaram um variado espectro de genótipos do HPV em amostras cérvico-vaginais. Entretanto, o MY09/11 é descrita como mais eficiente na amplificação de múltiplos tipos de HPV em uma determinada amostra (Iftner & Villa, 2003). Em nosso estudo, este achado é apoiado pelo maior número de detecção de DNA do HPV nas amostras provenientes das pacientes HIV-positivas, grupo conhecidamente mais propenso às infecções por múltiplos tipos de HPV (Chin-Hong & Palefsky, 2005).

A diferença na detecção de múltiplos tipos pode ser resultado do desenho dos primers. O sistema MY09/11 é degenerado, com 8 a 16 primers complementares variantes em cada fita, por esse motivo detecta maior número de tipos de HPV. Já o GP5+/GP6+ é um primer genérico com apenas uma cadeia complementar para cada fita do DNA do HPV. A limitação em identificar vários tipos pode ser um reflexo do tamanho reduzido (150pb) do produto de PCR gerado por GP5+/GP6+. Para Depuydt e col., 2007, a inserção de bases nucleotídicas nas posições de degeneração é um processo randômico e, conseqüentemente, não garante uma representação equivalente de todos os primers. A falha na detecção por MY09/11 pode ser causada pelo mau-pareamento entre os primers e a região L1 dos HPVs.

Para o sistema PGMY09/11, os membros do pool de primers foram escolhidos usando alinhamento de sequências de todos os tipos conhecidos de HPVs genitais, minimizando qualquer mau-pareamento potencial e simultaneamente minimizando o número de nucleotídeos em cada pool, resultando em uma melhora dos primers MY09/11, que continham bases

degeneradas (Iftner & Villa, 2003) e numa melhoria na detecção do DNA do HPV em amostras contendo múltiplos tipos virais. O uso do sistema PGMY pode oferecer uma mudança relativamente simples na tecnologia dos primers consensuais desenhados a partir da região L1 dos HPVs de alto-risco, o que pode ajudar a minimizar as detecções inespecíficas, incapazes de diferenciar os tipos de HPV presentes na amostra, fato conhecido por afetar a aceitação e a validação desse tipo de teste molecular.

Quando analisamos os resultados obtidos na literatura (Tabela 20) percebemos que a quantidade de trabalhos de comparação entre os primers mais comumente utilizados para a detecção molecular do HPV ainda é reduzida, porém, existem diversos trabalhos que utilizaram a PCR para detecção do HPV, cada um com um tipo diferente de primer. Quando fazemos a média da porcentagem de detecção obtida por esses estudos, a detecção do DNA do HPV é maior quando se utiliza os primers PGMY09/11 (61%), seguidos pelos primers GP5+/GP6+ (52%) e, por último, os primers MY09/11(49%). Percebemos ainda que os resultados de detecção variam consideravelmente. Essa variação nos índices de detecção pode estar relacionada às diferenças envolvendo o tipo e o tamanho amostral utilizado no estudo, ao grupo de pacientes escolhidas e à presença ou ausência de infecções por múltiplos tipos de HPV.

Nossos resultados diferem desse achado, uma vez que nossa detecção foi maior quando utilizamos os primers PGMY09/11, seguidos pelos primers MY09/11 e, por último, os primers GP5+/GP6+. Isso provavelmente se deve ao fato de que, comparativamente, ou seja, em um mesmo grupo amostral, com as mesmas condições, o sistema PGMY09/11 seja capaz de detectar um número maior de casos positivos e, o MY09/11 por ser uma metodologia semelhante, com algumas mudanças apenas, detecte menos casos que o PGMY09/11, sua versão melhorada. Porém ambos são capazes de detectar mais casos positivos do que os primers GP5+/GP6+. Se compararmos os estudos que simplesmente utilizaram esses primers, sem compará-los, os resultados então vão depender dos fatores citados anteriormente, baseando-se principalmente nas diferenças entre os três conjuntos de primers em questão.

Os artigos de comparação de primers já citados em nosso estudo (principalmente Gravitt *et al.*, 2000, Coutlée *et al.*, 2002, Qu *et al.*, 1997 e

Karlsen *et al.*, 1996) são artigos de comparação entre duas metodologias apenas, diferindo do nosso estudo que compara três métodos. O uso do teste kappa para a avaliação da concordância entre os métodos nesses estudos, mostra correlação excelente entre os primers PGMY09/11 e MY09/11 (Gravitt *et al.*, 2000) e boa correlação entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 (Qu *et al.*, 1997; Karlsen *et al.*, 1996).

Nosso estudo mostrou concordância moderada entre os primers GP5+/GP6+ e MY09/11, e entre GP5+/GP6+ e PGMY09/11, e concordância substancial entre MY09/11 e PGMY09/11, para os dois grupos de pacientes. Porém ao compararmos o significado estatístico de nosso estudo através do teste de Cochran para o grupo das pacientes HIV-positivas ($Q = 15,57$), observamos que existe diferença estatística significativa de acordo com a escolha dos primers, sendo que no nosso caso, o sistema PGMY09/11 foi o que forneceu um melhor resultado. O mesmo não aconteceu no grupo das pacientes HIV-negativas ($Q = 3,73$), cuja diferença estatística de acordo com o método utilizado não foi significativa. De acordo com o que já foi discutido anteriormente, esse fato pode ser explicado pela diferença entre os dois grupos amostrais, sendo que o grupo das pacientes HIV-positivas é, geralmente, tido como mais propenso a infecções por múltiplos tipos de HPV e sujeito a uma maior carga viral do HPV quando comparado ao grupo controle.

Se observarmos as diferenças estruturais entre os primers e as semelhanças entre eles, podemos ver que, realmente, a maior concordância está entre os primers mais parecidos (PGMY09/11 e MY09/11). Se levarmos em consideração os valores de kappa encontrados em nosso estudo, podemos afirmar que entre os três sistemas analisados, a pior concordância foi entre os sistemas GP5+/GP6+ e MY09/11, e entre GP5+/GP6+ e PGMY09/11, primers estruturalmente muito diferentes e cujas finalidades de detecção variam consideravelmente. Comparando os sistemas PGMY09/11 e MY09/11, a boa concordância observada mostra que ambos representam uma boa escolha para detecção de DNA de HPV em amostras colhidas à fresco (devido ao grande tamanho do fragmento amplificado). Porém, o sistema PGMY09/11 fornece um índice de detecção mais alto, sendo este um sistema mais propício para a detecção do HPV em amostras obtidas de pacientes cuja possibilidade de se encontrar múltiplos tipos do HPV e uma elevada carga viral seja maior.

Nosso estudo fez uma comparação entre os três sistemas de primers em um grupo de risco para a infecção pelo HPV, ou seja, as pacientes HIV-positivas, que apresentam o potencial agravante de uma elevada carga viral e a presença de múltiplos genótipos do vírus. Assim, nossos resultados apontam para uma diferença mais significativa para esse grupo de pacientes. Os primers PGMY09/11 conseguiram detectar um número maior de casos positivos para o HPV, reforçando a idéia de que seu uso seja mais adequado em estudos semelhantes ao nosso e confirmando os resultados obtidos pela literatura especializada. Assim, para a escolha do conjunto de primers a ser usado, deve-se observar a fonte de material biológico, o tamanho do produto da PCR, o espectro de tipos de HPVs amplificados (Qu *et al.*, 1997), as características do grupo amostral e as limitações de cada tipo de primer a ser testado.

Tabela 20. Estudos encontrados na literatura envolvendo detecção do DNA do HPV por diferentes metodologias baseadas em PCR.

Referência (1º Autor)/Ano	Amostras	Primers	Status do HIV	HPV + (%)	Média (Intervalo)
Coutlée, F., 2002	299	PGMY09/11	HIV -	176/299 (59)	61
Gravitt, P.E., 2000	247	PGMY09/11	HIV -	155/247 (63)	(59-63)
Cope, J.U., 1997	596	MY09/11	HIV -	189/596 (32)	
Szostek, S., 2006	125	MY09/11	HIV -	90/125 (72)	
Coutlée, F., 2002	299	MY09/11	HIV -	158/299 (53)	
Gravitt, P.E., 2000	247	MY09/11	HIV -	136/247 (55)	
Qu, W., 1997	208	MY09/11	HIV -	94/208 (45)	
Depuydt, C.E., 2007	15774	MY09/11	HIV -	9737/15774 (62)	
Karlsen, F., 1996	171	MY09/11	HIV -	142/171 (83)	49
Schiffman, M.H., 1991	120	MY09/11	HIV -	56/120 (47)	(15-83)
Zerbini, M., 2001	176	MY09/11	HIV -	106/176 (60)	
Nonnenmacher, B., 2002	975	MY09/11	HIV -	156/975 (16)	
Sherman, M.E., 2003	20810	MY09/11	HIV -	2979/20810 (15)	
Tsai, H.T., 2005	266	MY09/11	HIV -	107/266 (40)	
Levi, G., 2005	17	MY09/11	HIV -	8/17 (46)	
Moscicki, A.B., 2000	55	MY09/11	HIV -	30/55 (55)	
Qu, W., 1997.	208	GP5+/6+	HIV -	89/208 (43)	
Clavel, C., 1998	42	GP5+/6+	HIV -	34/42 (81)	
Kulmala, S.M., 2004	1511	GP5+/6+	HIV -	553/1511 (37)	
Speich, N., 2004	2916	GP5+/6+	HIV -	948/2916 (33)	52
Karlsen, F., 1996	171	GP5+/6+	HIV -	133/171 (78)	(33-81)
de Roda Husman, A.M., 1995	264	GP5+/6+	HIV -	114/264 (43)	
de Roda Husman, A.M., 1995	264	GP5/6	HIV -	102/264 (38)	38
Strickler, H.D., 2003	1816	MY09/11	HIV +	1162/1816 (64)	
Levi, G. 2005	84	MY09/11	HIV +	45/84 (53)	
Hankins, C., 1999	375	MY09/11	HIV +	252/375 (67)	61
Moscicki, A.B., 2000	133	MY09/11	HIV +	103/133 (77)	(43-77)
Cerqueira, D.M.	150	MY09/11	HIV +	64/150 (43)	
Paulo, M., 2007	27	PGMY09/11	HIV +	8/27 (30)	30

VII - Conclusões

Considerando os dados obtidos em nossos estudos, podemos concluir que:

- a) Diferenças significativas foram observadas na detecção de HPV utilizando os diferentes conjuntos de primers escolhidos para o estudo.
- b) O índice de detecção do DNA do HPV no grupo das pacientes HIV-positivas foi maior quando utilizados os primers PGMY09/11, comparados com os primers MY09/11 e GP5+/GP6+.
- c) A prevalência do DNA do HPV foi significativamente maior no grupo de pacientes HIV-positivas (43 amostras), ou seja, 75%, comparada a 45% no grupo de pacientes HIV-negativas.
- d) No grupo das pacientes HIV-positivas, apenas uma das 17 mulheres diagnosticadas com alterações cervicais não teve o DNA do HPV detectado pelo método da PCR, enquanto dentre as 43 pacientes detectadas como HPV-positivas, 63% (26/43) não apresentaram anormalidades citológicas pelo teste de *Papanicolaou*.
- e) No grupo das pacientes HIV-negativas, apenas três mulheres foram diagnosticadas com alterações citológicas. Dentre essas mulheres, uma não teve o DNA do HPV detectado por nenhum dos métodos de PCR utilizados no estudo, enquanto entre as 26 pacientes positivas para o HPV, 23 não apresentaram anormalidades citológicas pelo teste de *Papanicolaou*.
- f) Para o grupo das pacientes HIV-positivas, os primers GP5+/GP6+ e MY09/11 ($k=0.57$), e GP5+/GP6+ e PGMY09/11 ($k=0.60$) apresentaram concordância moderada. Já os conjuntos de primers MY09/11 e PGMY09/11 ($k=0.61$), apresentaram concordância substancial.
- g) Para o grupo das pacientes HIV-negativas, obtivemos o mesmo resultado, com os sistemas GP5+/GP6+ e MY09/11; GP5+/GP6+ e PGMY09/11 e MY09/11 e PGMY09/11, apresentando, respectivamente, concordância moderada, moderada e substancial.

VIII – Referências Bibliográficas

1. **Al-Daraji, W.I.; Smith, J.H.** Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. *Int J Clin Exp Pathol.* 2(1):48-64, 2008.
2. **Ault, K.A.** Clinical Study: Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections in the Female Genital Tract. *Infect Dis Obstet Gynecol.* Suppl:40470:1-5, 2005.
3. **Abdel Aziz, M.T., Abdel Aziz, M.Z., Atta, H.M., Shaker, O.G., Abdel Fattah, M.M., Mohsen, G.A., Ahmed, H.H., El Derwi, D.A.** Screening for Human papillomavirus (HPV) in Egyptian women by the second-generation hybrid capture (HC II) test. *Med Sci Monit.* 12(7): MT43-49, 2006. Disponível em: <http://www.medscimonit.com>. Acesso em: 14 jan. 2007.
4. **Bhatla, N., Moda, N.** The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res.* 130(3):261-265, 2009.
5. **Bory, J.P., Cucherousset, J., Lorenzato, M., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P., Clavel, C.** Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Intl J Cancer.* 102(5):519-25, 2002
6. **Bosch, F.X., Manos, M.M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 87(11):796-802, 1995.
7. **Bosch, F.X., Qiao, Y-L., Castellsagué, X.** Chapter 2: The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Intl J Gynecol and Obst.* 94(supplement1):S8-S21, 2006.

8. **Braun, L.** Role of Human Immunodeficiency Virus Infection in the Pathogenesis of Human Papillomavirus-Associated Cervical Neoplasia. *American J of Pathol.* 144(2):209-214, 1994.
9. **Canavan, T.P. and Doshi, N.P.** Cervical Cancer. *American Acad Family Phys.* 61:1369-1376, 2000.
10. **Cappiello, G., Garbuglia, A.R., Salvi, R., Rezza, G., Giuliani, M., Pezzotti, P., Suligoj, B., Branca, M., Migliore, G., Formigoni Pomponi, D., D'Ubaldo, C., Ippolito, G., Giacomini, G., Benedetto, A.** HIV infection increases the risk of squamous intra-epithelial lesions in women with HPV infection: an analysis of HPV genotypes. DIANAIDS Collaborative Study Group. *Int J Cancer.* 72(6):982-6, 1997.
11. **Carvalho, M.O.O., Almeida, R.W., Leite, F.M.S., Fellows, I.B., Teixeira, M.H., Oliveira, L.H.S., Cavalcanti, S.M.B.** Detection of Human Papillomavirus DNA by the Hybrid Capture Assay. *Braz J Infect Dis.* 7(2):121-125, 2003.
12. **Castle, P.E., Schiffman, M., Gravitt, P.E., Kendall, H., Fishman, S., Dong, H., Hildesheim, A., Herrero, R., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Lorincz, A., Schussler, J.E., Burk, R.D.** Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol.* 68(3):417-423, 2002.
13. **Castle, P.E., Schiffman, M., Scott, D.R., Sherman, M.E., Glass, A.G., Rush, B.B., Schussler, J.E., Wacholder, S., Lorincz, A.T.** Semiquantitative Human Papillomavirus Type 16 Viral Load and the Prospective Risk of Cervical Precancer and Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(5):1311-1314, 2005.
14. **Cerqueira, D.M., de S Moraes, D., Camara, G.N., Amaral, F.A., Oyama, C.N., dos Santos, M.Q., Martins, C.R.** High HPV genetic diversity in women infected with HIV-1 in Brazil. *Arch Virol.* 152(1):75-83, 2007.

15. **Chacón, J., Sanz, I., Rubio, M.D., de la Morena, M.L., Díaz, E., Mateos, M.L., Baquero, F.** Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo em muestras de lesiones cervicales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 25(5):311-316, 2007.
16. **Chin-Hong, P.V., Palefsky, J.M.** Human papillomavirus anogenital disease in HIV-infected individuals. *Dermatologic Therapy*, 18:67-76, 2005.
17. **Clavel, C., Masure, M., Putaud, I., Thomas, K., Bory, J-P., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P.** Hybrid Capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol.* 51:737-40, 1998.
18. **Clifford, G.M., Gallus, S., Herrero, R., Munõz, N., Snijders, P.J.F., Vaccarella, S., Anh, P.T.H., Ferreccio, C., Hieu, N.T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjosé, S., Shin, H.R., Sukvirach, S., Thomas, J.O., Tunsakul, S., Meijer, C.J.L.M., Franceschi, S., and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group.** Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancenet.* 366:991-998, 2005.
19. **Cope, J.U., Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Manos, M.M., Lörincz, A.T., Burk, R.D., Glass, A.G., Greer, C., Buckland, J., Helgesen, K., Scott< D.R., Sherman, M.E., Kurman,R.J., Liaw, K-L.** Comparison of the Hybrid Capture Tube Test and PCR for Detection of Human Papillomavirus DNA in Cervical Specimens. *J Clin Microbiol.* 35(9):2262-2265, 1997.
20. **Coutlée, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, C., Richardson, H., Lapointe, N., Voyer, H., The Canandian Women’s HIV Study Group and Franco, E.L.** Use of PGMV Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol.* 40(3):902-907, 2002.

21. **Crum, C.P.** Contemporary Theories of Cervical Carcinogenesis: The Virus, the Host and the Stem Cell. *Mod Pathol.* 13(3):243-251, 2000.
22. **Cubie, H.A., Seagar, A.L., Beattie, G.J., Monaghan, S., Williams, A.R.** A longitudinal study of HPV detection and cervical pathology in HIV infected women. *Sex Transm Inf.* 76:257-261, 2000. Disponível em: <http://www.sextrans.bmjournals.com>. Acesso em: 05 abr. 2006.
23. **Dames, D.N., Ragin, C., Griffith-Bowe, A., Gomez, P., Butler, R.** The prevalence of cervical cytology abnormalities and human papillomavirus in women infected with the human immunodeficiency virus. *Infect Agent Cancer.* 4(suppl.1):S8, 2009.
24. **Dehn, D., Torkko, K.C., Shroyer, K.R.** Human Papillomavirus Testing and Molecular Markers of Cervical Dysplasia and Carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 111:1-14, 2006.
25. **de Jong, A., van Poelgeest, M.I.E., van der Hulst, J.M., Drijfhout, J.W., Fleuren, G.J., Melief, C.J.M., Kenter, G., Offringa, R., van der Burg, S.H.** Human Papillomavirus Type 16-Positive Cervical Cancer Is Associated with Impaired CD4+ T-Cell Immunity against Early Antigens E2 and E6. *Cancer Res.* 64:5449-5455, 2004.
26. **De Marco, F., Di Carlo, A., Poggiali, F., Muller, A., Marcante, M.L.** Detection of HPV in genital condylomata: correlation between viral load and clinical outcome. *J Exp Clin Cancer Res.* 20(3):377-83, 2001
27. **Depuydt, C.E., Boulet, G.A.V., Horvath, C.A.J., Benoy, I.H., Vereecken, A.J., Bogers, J.J.** Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *J Cell Mol Med.* 11(4):881-891, 2007.
28. **de Roda Husman, A-M., Walboomers, J.M.M., van der Brule, A.J.C., Meijer, C.J.L.M., Snijders, P.J.F.** The use of general primers GP5 and GP6

elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 765:1057-1062, 1995.

29. **de Sanjosé, S., Santamaria, M., Alonso de Ruiz, P., Aristizabal, N., Guerrero, E., Castellsagué, X., Bosch, F.X.** Review: HPV types in women with normal cervical cytology. *IARC Sci Publ.* 119:75-84, 1992.

30. **Dollard, S.C., Wilson, J.L., Demeter, L.M., Bonnez, W., Reichman, R.C., Broker, T.R., Chow, L.T.** Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. *Genes Dev.* 6(7):1131-1142, 1992.

31. **Ellerbrock, T.V., Chiasson, M.A., Bush, T.J., Sun, X.W., Sawo, D., Brudney, K., Wright Jr., T.C.** Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA.* 283(8):1031-1037, 2000.

32. **Faria, I.M., Melo, V.H., de Castro, L.P., de Faria, F.M., Carvalho, N.O., de Araújo, A.C., de Oliveira, H.C.** Accuracy of oncotoc cytology for HPV infection diagnosis on the cervix uteri of HIV-infected women. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 30(9):434-444, 2008.

33. **Farthing, A., Masterson, P., Mason, W.P., Vousden, K.H.** Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol.* 47:649-652, 1994.

34. **Flores-Munguia, R., Siegel, E., Klimecki, W.T., Giuliano, A.R.** Performance Assessment of Eight High-Throughput PCR Assays for Viral Load Quantitation of Oncogenic HPV Types. *J Mol Diag.* 6(2):115-24, 2004.

35. **Flores-Munguia, R., Papenfuss, M., Klimecki, W.T, Giuliano, A.R.** Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 118(5):1187-93, 2006.

36. **Fontaine, J., Hankins, C., Mayrand, M-H., Lefevre, J., Money, D., Gagnon, S., Rachlis, A., Poursaux, K., Ferenczy, A., the Canadian Women's HIV Study Group and Coutlée, F.** High levels of HPV-16 DNA are associated with high-grade cervical lesions in women at risk or infected with HIV. *AIDS*. 19:785-94, 2005.
37. **Fontaine, J., Gravitt, P., Duh, L-M., Lefevre, J., Poursaux, K., Hankins, C., Coutlée, F., and Tha Canadian Women's HIV Study Group.** High Level of Correlation of Human Papillomavirus-16 DNA Viral Load Estimates Generated by Three Real-Time PCR Assays Applied on Genital Specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14(9):2200-2207, 2007.
38. **Franco, E.L., Villa, L.L., Sobrinho, J.P., Prado, J.M., Rousseau, M-C., Désy, M., Rohan, T.E.** Epidemiology of Acquisition and Clearance of Cervical Human Papillomavirus Infection in Women from a High-Risk Area for Cervical Cancer. *J Infect Dis*. 180:1415-1423, 1999.
39. **Franco, E.L.; Duarte-Franco, E.; Ferenczy, A.** Cervical câncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 167:1017-1025, 2001.
40. **Franco, E.L.** Chapter 13: Primary Screening of Cervical Cancer With Human Papillomavirus Tests. *J Natl Cancer Inst Monographs*. 31:89-96, 2003.
41. **Franco, E.L.; Harper, D.M.** Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control. *Vaccine*. 23:2388-2394, 2005.
42. **Freitas, T.P; Carmo, B.B.; Paula, F.D.F.; Rodrigues, L.F.; Fernandes, A.P.; Fernandes, P.A.** Molecular Detection of HPV 16 and 18 in Cervical Samples of Patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 49:297-301, 2007.

43. **Ginocchio, C.C.; Barth, D.; Zhang, F.** Comparison of the Third Wave Invader Human Papillomavirus (HPV) Assay and the Digene HPV Hybrid Capture 2 Assay for Detection of High-Risk HPV DNA. *J Clin Microbiol.* 46:1641-1646, 2008.
44. **Gómez, D.T., Santos, J.L.** Human Papillomavirus Infection And Cervical Cancer: Pathogenesis And Epidemiology. *Communicating Current Research and Educ Topics and Trends in Applied Microbiol A. Méndez-Vilas.* 680-687, 2007.
45. **Gonçalves, M.A., Massad, E., Burattini, M.N., Villa, L.L.** Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos City, São Paulo, Brazil. *Intl J STD AIDS.* 10(12):803-807, 1999.
46. **Gravitt, P.E.; Peyton, C.L., Alessi, T.Q., Wheeler, C.M., Coutlée, F., Hildesheim, A., Schiffman, M.H., Scott, D.R., Apple, R.J.** Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 38(1):357-361, 2000.
47. **Gravitt, P.E., Burk, R.D., Lorincz, A., Herrero, R., Hildesheim, A., Sherman, M.E., Bratti, M.C., Rodriguez, A.C., Helzlsouer, K.J., Schiffman, M.** A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA Quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12:477-484, 2003.
48. **Hankins, C., Coutlée, F., Lapointe, N., Simard, P., Tran, T., Samson, J., Hum, L.** Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group. *CMAJ.* 160(2):185-191, 1999.
49. **Hart, K.W., Williams, O.M., Thelwell, N., Fiander, A.N., Brown, T., Borysiewicz, L.K., Gelder, C.M.** Novel Method for Detection, Typing, and

Quantification of Human Papillomavirus in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 39(9):3204-3212, 2001.

50. **Heard, I., Tassie, J.M., Schmitz, V., Mandelbrot, L., Kazatchkine, M.D., Orth, G.** Increased risk of cervical disease among human immunodeficiency virus-infected women with severe immunosuppression and high human papillomavirus load(1). *Obstet Gynecol.* 96(3):403-409, 2000.

51. **Hebner, C., Beglin, M., Laimins, L.A.** Human Papillomavirus E6 Proteins Mediate Resistance to Interferon-Induced Growth Arrest through Inhibition of p53 Acetylation. *J Virol.* 81(23):12740-12747, 2007.

52. **Hesselink, A.T.** Comparison of Three Different PCR Methods for Quantifying Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Scrape Specimens. *J Clin Microbiol.* 43(9):4868-4871, 2005.

53. **Ho, C.M., Cheng, W.F., Chu, T.Y., Chen, C.A., Chuang, M.H., Chang, S.F., Hsieh, C.Y.** Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer.* 95(10):1384-1389, 2006.

54. **Howland, R.H.** How are drugs approved? Part 1: the evolution of the Food and Drug Administration. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv.* 46(1):15-19, 2008.

55. **Hubbard, R.A.** Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med.* 127:940-945, 2003.

56. **Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K.I., Watkins-Riedel, T., Singer, C.F., Kubista, E., Czerwenka, K.F.** Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 92(3):873-880, 2004.

57. **INCA.** Prevalência do Câncer de Colo do Útero. Instituto Nacional do Câncer. Brasil, 2008. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

58. **Iftner, T., Villa, L.L.** Chapter 12: Human Papillomavirus Technologies. *J Natl Canc Inst Monographs*. 31:80-88, 2003.
59. **Janicek, M.F. and Hervy, E.A.** Cervical Cancer: Prevention, Diagnosis, and Therapeutics. *CA Cancer J Clin*.51:92-114, 2001.
60. **Josefsson, A.M., Magnusson, P.K., Ylitalo, N., Sorensen, P., Qwarforth-Tubbin, P., Andersen, P.K., Melbye, M., Adami, H.O., Gyllensten, U.B.** Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 355(9222):2189-93, 2000.
61. **Karlsen, F., Kalantari, M., Jenkins, A., Pettersen, E., Kristensen, G., Holm, R., Johansson, B., Hagmar, B.** Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 34(9):2095-2100, 1996.
62. **Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., Schiffman, M.** The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. *J Natl Cancer Inst*. 97(14):1072-1079, 2005.
63. **Klaes, R., Woerner, S.M., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz, B., Melsheimer, P., Doeberitz, M.K.** Detection of High-Risk Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer by Amplification of Transcripts from Integrated Papillomavirus Oncogenes. *Cancer Res*. 59:6132-6136, 1999.
64. **Kulmala, S-M.** Human Papillomavirus Testing with the Hybrid Capture 2 Assay and PCR as Screening Tools. *J Clin Microbiol*. 42(6):2470-2475, 2004.
65. **Lai, H.C., Peng, M.Y., Nieh, S., Yu, C.P., Chang, C.C., Lin, Y.W., Sun, C.A., Chu, T.Y.** Differential viral loads of human papillomavirus 16 and 58

infections in the spectrum of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer*. 16(2):730-735, 2006.

66. **Lefevre, J., Hankins, C., Money, D., Rachlis, A., Pourreaux, K., The Canadian Women's Study Group and Coutlée, F.** Human Papillomavirus Type 16 Viral Load Is Higher in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women with High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Than in Those with Normal Cytology Smears. *J Clin Microbiol*.42(5):2212-2215, 2004.

67. **Levi, G., Feldman, J., Holman, S., Salarieh, A., Strickler, H.D., Alter, S., Minkoff, H.** Relationship between HIV viral load and Langerhans cells of the cervical epithelium. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 31(2):178-184, 2005.

68.a. **Levi, J.E., Fink, M.C.S., Canto, C.L.M., Carretiero, N., Matsubara, R., Linhares, I., das Dores, G.B, Castelo A, Segurado A, Uip DE, Neto JE.** Human Papillomavirus Prevalence, Viral Load and Cervical Intraepithelial Neoplasia in HIV-Infected Women. *Braz J Inf Dis.* 6(3):129-134, 2002.

68.b. **Levi, J.E., Kleter, B., Quint, W.G.V., Fink, M.C.S., Canto, C.L.M., Matsubara, R., Linhares, I., Segurado, A., Vanderborght, B., Neto, J.E., van Doorn, L.J.** High Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) Infections and High Frequency of Multiple HPV Genotypes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women in Brazil. *J Clin Microbiol.* 40:3341-3345, 2002.

69. **Liaw, K.L., Hsing, A.W., Chen, C.J., Schiffman, M.H., Zhang, T.Y., Hsieh, C.Y., Greer, C.E., You, S.L., Huang, T.W., Wu, T.C.** Human papillomavirus and cervical cancer: a case control study in Taiwan. *Int J Cancer*. 62(5):565-71, 1995.

70. **Liaw, K.L., Glass, A.G., Manos, M.M., Greer, C.E., Scott, D.R., Sherman, M., Burk, R.D., Kurman, R.J., Wacholder, S., Rush, B.B., Cadell, D.M., Lawler, P., Tabor, D., Schiffman, M.** Detection of Human Papillomavirus DNA

in Cytologically Normal Women and Subsequent Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *J Natl Canc Inst.* 91(11):954-960, 1999.

71. **Lillo FB, Lodini S, Ferrari D, Stayton C, Taccagni G, Galli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C.** Determination of Human Papillomavirus (HPV) Load and Type in High-Grade Cervical Lesions Surgically Resected from HIV-Infected Women during Follow-up of HPV Infection. *Clin Inf Dis.* 40: 451-457, 2005.

72. **Lo, K.W., Wong, Y.F., Chan, M.K., Li, J.C., Poon, J.S., Wang, V.W., Zhu, S.N., Zhang, T.M., He, Z.G., Wu, Q.L., Li, G.D., Tam, J.S., Kahn, T., Lam, P., Cheung, T.H., Chung, T.K.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China. *Int J Cancer.* 100(3):327-31, 2002.

73. **Mack, D.H., Sninsky, J.J.** A sensitive method for the identification of uncharacterized viruses related to known virus groups: hepadnavirus model system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(18):6977-81, 1988.

74. **Mandelblat, J.S., Kanetsky, P., Eggert, L., Gold, K.** Is HIV Infection a Cofactor for Cervical Squamous Cell Neoplasia? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8:97-107, 1999.

75. **McNabb, D.E.** Research Methods for Political Science: Quantitative and Qualitative Methods. *M.E. Sharp,* 2004.

76. **Moberg, M. Gustavsson, I., Gyllensten, U.** Real-Time PCR-Based System for Simultaneous Quantification of Human Papillomavirus Types Associated with High Risk of Cervical Cancer. *J Clin Microbiol.* 41(7):3221-3228, 2003.

77. **Moscicki, A-B., Ellenberg, J.H., Vermund, S.H., Holland, C.A., Darragh, T., Crowley-Nowick, P.A., Levin, L., Wilson, C.M.** Prevalence of and Risks for Cervical Human Papillomavirus Infection and Squamous Intraepithelial Lesions in Adolescent Girls – Impact of Infection With Human Immunodeficiency Virus. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 154:127-134, 2000.

78. **Nonnenmacher, B. Breitenbach, V., Villa, L.L., Prolla, J.C., Bozetti, M.C.** Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Publ.* 36(1):95-100, 2002. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Acesso em: 22 jan. 2007.
79. **Novaes, L.C.G., Novaes, M.R.C.G., Simões-Barbosa, A.** Diagnosis of Human Papillomatosis by Polymerase Chain Reaction in Cases of Divergency Between Results of Hybrid Capture and Papanicolaou Cytology. *Braz J Inf Dis.* 10(3):169-172, 2006.
80. **Odida, M., de Sanjosé, S., Quint, W., Bosch, X.F., Klaustermeier, J., Weiderpass, E.** Human Papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer in Uganda. *BMC Inf Dis.* 8:85-92, 2008.
81. **Palefsky, J.M., Holly, E.A.** Review: Molecular Virology and epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4:415-428, 1995.
82. **Palefsky, J.M., Minkoff, H., Kalish, L.A., Levine, A., Sacks, H.S., Garcia, P., Young, M., Melnick, S., Miotti, P., Burk, R.** Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection in Human Immunodeficiency Vírus-1 (HIV)- Positive and High-Risk HIV-Negative Women. *J Natl Cancer Inst.* 3:226-236, 1999.
83. **Palefsky, J.** Biology of HPV in HIV Infection. *Adv Dent Res.* 19:99-105, 2006.
84. **Paulo, M., Borges, A.B., Duarte, G., Quintana, S.M., Montes, M.B.A., Tolo, M.R.T.** The Environmental Cofactors in Carcinogenesis in High Risk HPV/HIV-Positive Women. *Braz J Inf Dis.* 11(2):189-195, 2007.
85. **Park, T.W., Richart, R.M., Sun, X-W., Wright, Jr., T.C.** Associations Between Human Papillomavirus Type and Clonal Status of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *J Natl Cancer Inst.* 88(6):355-358, 1997.

86. **Peitsaro, P., Johansson, B., Syrjänen, S.** Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol.* 40(3):886-891, 2002.
87. **Pérez-Plasencia, C., Vázquez-Ortiz, G., López-Romero, R., Pinã-Sanchez, P., Moreno, J., Salcedo, M.** Genome wide expression analysis in HPV16 Cervical Cancer: identification of altered metabolic pathways. *Inf Agents and Cancer.* 2:16, 2007.
88. **Qu, W., Jiang, G., Cruz, Y., Chang, C.J., Ho, G.Y.F., Klein, R.S., Burk, R.D.** PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/11 and GP5+/GP6+ Primer Systems. *J Clin Microbiol.* 35(6):1304-1310, 1997.
89. **Rabelo-Santos, S.H., Zeferino, L., Villa, L.L., Sobrinho, J.P., Amaral, R.G., Magalhães, A.V.** Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(2):181-184, 2003.
90. **Riethmuller, D., Ramanah, R., Pretet, J.L., Mougin, C.** Integrating HPV testing for primary screening? *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1:S139-151, 2008.
91. **Russomano, F., Monteiro, A.C.S., Mousinho, R.O.** O diagnóstico citológico de células escamosas atípicas: uma avaliação crítica das recomendações diagnósticas. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 30(11), 2008.
92. **Saddi, V.A.** Detecção de HPV e Identificação de Genes Hiperexpressos em Adenocarcinomas de Colo Uterino. Tese de Doutorado, na área de Fisiologia Humana. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil, 2004.
93. **Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Lorincz, A.T., Manos, M.M., Byrne, J.C., Glass, A.G., Cadell, D.M., Howley, P.M.** Comparison of Southern Blot

Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Human Papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol.* 29(3):573-577, 1991.

94. **Schiffman, M.H., Brinton, L.A.** The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer.* 76(10 Suppl.):1888-901, 1995.

95. **Schneider, A.** Pathogenesis of genital HPV infection. *Genitourin Med.* 69:165-173, 1993.

96. **Sherman, M.E., Wang, S.S., Wheeler, C.M., Rich, L., Gravitt, P.E., Tarone, R., Schiffman, M.** Determinants of Human Papillomavirus Load among Women with Histological Cervical Intraepithelial Neoplasia 3: Dominant Impact of Surrounding Low-Grade Lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12: 1038-1044, 2003.

97. **Sichero, L., Villa, L.L.** Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz J Med Biol Res.* 39(6): 707-717, 2006.

98. **Snijders, P.J.F., van den Brule, A.J.C., Schrijnemakers, H.F.J., Snow, G., Meijer, C.J.L.M., Walboomers, J.M.M.** The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol.* 71:173-181, 1990.

99. **Speich, N., Schmitt, C., Bollmann, R., Bollmann, M.** Human Papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *J Med Microbiol.* 53:125-128, 2004.

100. **Stoler, M.H., Broker, T.R.** In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. *Human Pathol.* 17(12):1250-1258, 1986.

101. **Stoler, M.H., Wolinsky, S.M., Whitbeck, A., Broker, T.R., Chow, L.T.** Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology*. 172(1):331-340, 1989.
102. **Strickler, H.D., Palefsky, J.M., Shah, K.V., Anastos, K., Klein, R.S., Minkoff, H., Duerr, A., Massad, L.S., Celentano, D.D., Hall, C., Fazzari, M., Cu-Uvin, S., Bacon, M., Schuman, P., Levine, A.M., Durante, A.J., Gange, S., Melnick, S., Burk, R.D.** Human Papillomavirus Type 16 and Immune Status in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women. *J Natl Cancer Inst*. 14:1062-1071, 2003.
103. **Strickler, H.D., Burk, R.D., Fazzari, M., Anastos, K., Minkoff, H., Massad, L.S., Hall, C., Bacon, M., Levine, A.M., Watts, D.H., Silverberg, M.J., Xue, X., Schlecht, N.F., Melnick, S., Palefsky, J.M.** Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. 97(8):577-86, 2005.
104. **Sun, X.W., Kuhn, L., Ellerbrock, T.V., Chiasson, M.A., Bush, T.J., Wright Jr., T.C.** Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 337(19):1343-9, 1997.
105. **Sun, C.A., Liu, J.F., Wu, D.M., Nieh, S., Yu, C.P., Chu, T.Y.** Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Intl J Gynecol & Obst*. 76:41-47, 2002.
106. **Swan, D.C., Tucker, R.A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M.F., Wideroff, L., Unger, E.R., Nisenbaum, R.A., Reeves, W.C., Icenogle, J.P.** Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *J Clin Microbiol*. 37(4):1030-1034, 1999.
107. **Szostek, S., Klimek, M., Zawilinska, B., Rys, J., Kopec, J., Daszkiewicz, E.** Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens

by hybrid capture and PCR with different primers. *Acta Biochimica Polonica*. 53(3):603-607, 2006. Disponível em: www.actabp.pl. Acesso em: 20 nov. 2008.

108. **Tsai, H.T., Wu, C.H., Lai, H.L., Li, R.N., Tung, Y.C., Chuang, H.Y., Wu, T.N., Lin, L.J., Ho, C.K., Liu, H.W., Wu, M.T.** Association between Quantitative High-Risk Human Papillomavirus DNA Load and Cervical Intraepithelial Neoplasm Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14(11):2544-2549, 2005.

109. **Tiro, J.A., Meissner, H.I., Kobrin, S., Chollette, V.** What Do Women in the U.S. Know about Human Papillomavirus and Cervical Cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16(2):288-294, 2007.

110. **Vaccarella, S., Herrero, R., Dai, M., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., Thomas, J.O., Anh, P.T.H., Ferreccio, C., Matos, E., Posso, H., de Sanjosé, S., Shin, H-R., Sukvirach, S., Lazcano-Ponce, E., Ronco, G., Rajkumar, R., Qiao, Y-L., Munõz, N., Franceschi, S., and the IARC HPV Prevalence Surveys Study Group.** Reproductive Factors, Oral Contraceptive Use, and Human Papillomavirus Infection: Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(11):2148-2153, 2006.

111. **Vernon, S.D., Hart, C.E., Reeves, W.C., Icenogle, J.P.** The HIV-1 tat protein enhances E2-dependent human papillomavirus 16 transcription. *Virus Res*. 27(2):133-145, 1993.

112. **Villa, L.L., Denny, L.** Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Intl J Gynecol Obst*. 94(1 Suppl.):S71-S80, 2006.

113. **Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Dürst, M., Schneider, A., Doeberitz, M.K.** Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Res*. 68(1):307-313, 2008.

114. **Weissenborn, S.J., Funke, A.M., Hellmich, M., Mallmann, P., Fuchs, P.G., Pfister, H.J., Wieland, U.** Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol.* 41(6):2763-2767, 2003.
115. **Wu, Y., Chen, Y., Li, L., Yu, G., Zhang, Y., He, Y.** Associations of high-risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. *J Clin Virol.* 35(3):264-269, 2006.
116. **Xi, L.F., Koutsky, L.A., Galloway, D.A., Kuypers, J., Hughes, J.P., Wheeler, C.M., Holmes, K.K., Kiviat, N.B.** Genomic Variation of Human Papillomavirus Type 16 and Risk for High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 89(11):796-802, 1997.
117. **Ylitalo, N., Josefsson, A., Melbye, M., Sörensen, P., Frisch, M., Andersen, P.K., Spären, P., Gustafsson, M., Magnusson, P., Pontén, J., Gyllensten, U., Adami, H-O.** A prospective Study Showing Long-Term Infection with Human Papillomavirus 16 before the Development of Cervical Carcinoma *in Situ*. *Cancer Res.* 60:6027-6032, 2000.
118. **Zerbini, M., Venturoli, S., Cricca, M., Gallinella, G., De Simone, P., Costa, S., Santini, D., Musiani, M.** Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J Clin Pathol.* 54:377-80, 2001. *Disponível em:* <http://www.jcp.bmjournals.com>. Acesso em: 10 out. 2006.

ANEXO 1

Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás (COEP – UCG).

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

Page 1 of 1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0127.0.168.000-06	
Projeto de Pesquisa Avaliação da Carga Viral do Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em Goiânia, Brasil.			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Biossegurança		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 17009006172	Pesquisador Responsável Vera Aparecida Saddi	 Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 22/11/2006	Recebimento: Assinatura		

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

Andamento do Projeto

Página 1 de 1

Andamento do projeto - CAAE - 0127.0.168.000-06				
Título do Projeto de Pesquisa Avaliação da Carga Viral do Papilomavírus Humano (HPV) em Mulheres Infectadas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em Goiânia, Brasil.				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	22/11/2006 10:38:37	14/05/2007 16:31:28		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	22/11/2006 10:38:37	Folha de Rosto	0127.0.168.000-06	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	21/11/2006 14:48:23	Folha de Rosto	FR116048	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	14/05/2007 16:31:27	Folha de Rosto	0577	CEP
Voltar				

ANEXO 2

Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia – Mestrado em Genética

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelo telefone (62) 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Comparação de diferentes conjuntos de primers para detecção de HPV em mulheres HIV-positivas e HIV-negativas.

Pesquisador Responsável : Vera Aparecida Saddi (CPF: 170090061-72)
Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 8111-9467

Pesquisadores participantes: Fernanda Cristina de Lima (CPF: 003356891-08)
Luciana Pinheiro Vaz (CPF: 776530091-15)
Sílvia Helena Rabelo-Santos (CPF: 375166551-04)
Marcos Vinicius Milki (CPF: 382654271-15)
Rosane Ribeiro F. Alves (CPF: 288378516-34)

Telefones para contato: (62) 3275 2603 (Fernanda Cristina de Lima)

Descrição da Pesquisa:

O fato de que a infecção pelo HPV é fator causal no desenvolvimento do câncer cervical fornecem o requisito necessário para a inclusão dos testes de detecção de HPV na rotina ginecológica. A detecção do vírus permite a detecção precoce da infecção pelo HPV, possibilitando intervenções no desenvolvimento de lesões precursoras e dessa forma, diminuindo o risco de progressão para o câncer cervical. Diferenças existentes nas sequências de nucleotídeos que determinam as regiões precoces e tardias do genoma do HPV são responsáveis pela existência dos diversos tipos de HPVs conhecidos.

Essas variações também são responsáveis pelo grau de transformação e potencial oncogênico do vírus. Assim, tais regiões podem ser exploradas para o desenvolvimento de testes moleculares tipo-específicos ou que envolvam o maior número possível de tipos de HPV. Existem dois grupos de métodos principais para a detecção de HPV: a hibridização direta (*Southern blot*, *dot blot*, e hibridização *in situ*) e a amplificação gênica (técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase – PCR).

As metodologias baseadas em PCR, utilizando primers consensuais, permitem a detecção de um grande número de tipos de HPV simultaneamente. Os primers são desenvolvidos tendo como alvo regiões conservadas do genoma do HPV entre diferentes tipos virais.

ANEXO 2

Objetivo: avaliar a infecção pelo HPV em dois grupos de mulheres, HIV-positivas e HIV-negativas, comparando as três metodologias de PCR mais utilizadas na detecção do HPV atualmente, utilizando os conjuntos de primers GP5+/GP6+; MY09/11 e PGMY09/11.

Metodologia: Após concordarem em participar do projeto as pacientes deverão assinar este termo. Só então serão encaminhadas para coleta de material cérvico-vaginal para exame citológico e detecção do DNA do HPV por PCR.

Coleta de espécimes cérvico-vaginais: Com uma cérvix brush e escova de cytobrush serão coletados material da ectocérvice e endocérvice para exame citopatológico. O material será também submetido aos testes de biologia molecular (PCR). Após o diagnóstico as pacientes poderão ser atendidas no ambulatório de ginecologia da Santa Casa de Misericórdia, com seguimento apropriado e/ou tratamento.

A paciente que, voluntariamente, concordar em participar e assinar este termo passará pela coleta cervical realizada por uma ginecologista habilitada, procedimento que não deverá fornecer nenhum risco à paciente.

Os dados pessoais de cada paciente serão mantidos em absoluto sigilo e os resultados obtidos serão utilizados apenas para fins científicos, podendo ser publicados em revistas e jornais especializados.

O projeto tem duração de 24 meses, podendo ser prorrogado, devendo ser concluído até março de 2009. A paciente tem garantia expressa de liberdade para retirar o consentimento escrito e se desligar da pesquisa em qualquer fase que julgar necessária.

Vera Aparecida Saddi

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/ n.º de prontuário/ n.º de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

ANEXO 3

Universidade Católica de Goiás

Projeto: Comparação de diferentes conjuntos de primers para detecção do HPV em mulheres HIV-positivas e HIV-negativas.

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Endereço: _____

_____ Telefone _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Estado Civil: () – solteiro () – casado () - Outro _____

Profissão: _____ Renda familiar mensal: _____

Escolaridade: _____ Raça/Cor: _____

Paridade: G: ___/P: ___/A: ___ Idade à primeira relação sexual: _____

Número de parceiros: _____ História de prostituição: () – Sim () – Não

Contato homossexual: () – Sim () – Não

Tabagismo: () – Sim () – Não Etilismo: () – Sim () – Não

Já foi tratado(a) para algum tipo de DST? () – Sim () – Não

Qual? _____

Uso de preservativos: () – Frequentemente () – Ocasionalmente () - Raramente

Data do último exame ginecológico ___/___/___ Local : _____

Dados sobre HIV/AIDS:

Contagem linfócitos TCD4: _____ Data: _____

Carga Viral do HIV: _____ Data: _____

Faz uso de algum tipo de medicamento? () Sim () Não

Qual? _____

Os dados desta ficha foram coletados por _____

Em ___/___/___

ANEXO 4

Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% do material proveniente das reações de PCR realizadas.

Para visualização dos fragmentos liberados por cada conjunto de primer utilizado, o material proveniente das reações de PCR foi analisado em gel de poliacrilamida 8%, posteriormente corado por nitrato de prata. Para o preparo de um gel com volume de 50ml, utilizamos 34 ml de água deionizada e acrescentamos 10 ml de acrilamida 40%, 5ml de tris-borato EDTA (TBE) 10x, 500 µL de persulfato de amônia (APS)10x e 50 µL de TEMED. A solução foi então acondicionada em placas de vidros até total polimerização. As canaletas formadas eram limpas com TBE 1x para posterior aplicação das amostras. Apenas 10 µL de cada amostra era aplicado no gel, juntamente com 3 µL de tampão de corrida 10x (composto por EDTA, glicerol e azul de bromofenol). Para cada gel era também aplicado um controle negativo (reagentes da reação de PCR sem o DNA), um controle positivo (material contendo amostra comprovadamente positiva para o HPV) e um marcador de 50 pb para conferência do tamanho do fragmento obtido. A corrida eletroforética tinha duração de 2 horas para GAPDH e GP5+/GP6+ e de 4 horas para MY09/11 e PGMY09/11. A fonte era configurada a 200 Volts, 150 Amperes e 100 Watts, independente do tipo de primer utilizado.

Após o término da eletroforese, o gel era corado pelo método de Nitrato de Prata. Para a coloração utilizamos as seguintes soluções de uso:

a) Solução de Fixação: 50 mL de etanol P.A.; 2 mL de ácido acético; 248 mL de água deionizada.

b) Solução de Coloração (AgNO₃) 15%: 15g de nitrato de prata (AgNO₃); 100 mL de água deionizada.

c) Solução de Revelação NaOH 2,5%: 4,5g de hidróxido de sódio (NaOH); 3 mL de formaldeído 37%; 200 mL de água deionizada.

O gel era então depositado em um recipiente de plástico limpo, adicionando-se a ele 150 mL de solução de fixação. Logo após era adicionado 2 mL de solução de coloração 15% agitando por 5 minutos. A solução era desprezada e o gel lavado com água deionizada por 15 segundos, por 3 vezes. Em seguida era adicionada a solução de revelação e 2 mL de formaldeído (no momento do uso) a 37% na parede do recipiente sob homogeneização contínua, até o surgimento das bandas. Quando as bandas eram visualizadas, a solução de revelação era desprezada e o restante da solução de fixação (150 mL) era adicionado ao gel. As bandas formadas eram então analisadas, comparando-as com o marcador utilizado e o controle positivo. O gel era então prensado à vácuo para sua secagem e armazenamento.