

**JOSÉ PIRES RIBEIRO JÚNIOR**

**SISBI/UFU**



1000244182

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
NO DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA  
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

**Universidade Federal de Uberlândia  
2001**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

M011  
616.184.15  
24842  
TE S/MEB

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE  
NO DIAGNÓSTICO E PREVALÊNCIA  
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

José Pires Ribeiro Júnior

**Orientador:  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Co-Orientador:  
Prof. Dr. Renato E. Sologuren Achá**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Clínica  
Médica, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do Grau de  
Mestre em Clínica Médica.

**Uberlândia - MG  
Agosto - 2001**

*Mude,  
mas comece devagar  
porque a direção é mais importante  
que a velocidade.*

*Você certamente conhecerá coisas melhores  
e coisas piores do que as já conhecidas,  
mas não se isso que importa.  
O mais importante é a mudança  
o movimento,  
o dinamismo,  
a energia.  
Só o que está morto não muda !*

**Clarice Lispector**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais:*

*José Pires Ribeiro e Eurípedes Borges Ribeiro  
que são a razão de tudo isto estar acontecendo.*

*A minha esposa Débora,  
com a qual eu aprendi e amadureci muito ao longo  
destes anos de convivência.*

*Ao meu filho João Vítor - alegria da minha vida –  
que mal acabara de nascer reforçou-me o valor de  
sempre lutar pela vida.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS:**

Ao meu Orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho,  
pelo estímulo, respeito e amizade demonstrados ao longo da  
realização deste trabalho. Sua inestimável ajuda fez deste  
projeto uma realidade que indiscutivelmente colaborou no meu  
crescimento profissional. Obrigado !

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Renato E. Sologuren Achá  
que pela sua determinação e coragem, conseguiu fazer do seu  
sonho uma realidade que se estendeu ao sonho de muitos de  
nós mestrandos. Minha eterna gratidão.

## AGRADECIMENTOS:

A Deus que, além da vida sempre me dá força para vencer os desafios desta jornada.

A minha avó Nenzinha, pelo carinho e a grandiosidade de ensinar-me que é sempre possível superar todas as dificuldades da vida.

Aos meus tios [pais] João Cruvinel e Eurípedes Geralda e ao meu primo [irmão] João Júnior exemplos vivos de luta e fé em Deus, com os quais eu muito aprendo.

Ao meu irmão Taylor, certo de poder contar com seu apoio e amizade em todos os momentos.

A Dr<sup>a</sup>. Eliane Machado Guimarães, pioneira no estudo do HPV nesta região e que, com sua competência, contribuiu para o conteúdo final desta pesquisa.

Aos biólogos Ana Cândida Saraiva, Karla Linhares e Gismar Vieira que, sem a ajuda destes, jamais este trabalho teria sido realizado.

Aos professores, secretarias, e colegas do Departamento de Ginecologia da UFU, pela cooperação durante a realização deste estudo.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram, apoiaram e acreditaram nesta conquista.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1. Material biológico .....	34
3.2. Extração do DNA do material endocervical.....	35
3.3. Reação em cadeia da polimerase .....	36
3.4. Eletroforese em gel de agarose e visualização da amplificação	37
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida e visualização da amplificação .....	38
3.6. Análise estatística dos resultados .....	39
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Tipos de HPV associados a lesões anogenitais .....	15
TABELA 2. Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase .....	36
TABELA 3. Diagnóstico da infecção por HPV pela PCR .....	42
TABELA 4. Resultado individual por amostra para o <i>primer</i> MYO9/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	44
TABELA 5. Positividade total para o <i>primer</i> MYO9/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	45
TABELA 6. Resultado individual por amostra para o <i>primer</i> GP5+/GP6+ em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	48
TABELA 7. Resultado total para o <i>primer</i> GP5+/GP6+ em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	49
TABELA 8. Diagnóstico em géis de Agarose e Poliacrilamida no resultado positivo total ou positivo comum aos dois <i>primers</i> ..	51

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1.</b> Estrutura do genoma do HPV 16 .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Expressão dos genes do HPV no epitélio cervical .....	5
<b>FIGURA 3.</b> Ação do E6 e E7 na célula hospedeira .....	10
<b>FIGURA 4.</b> Patogenia do HPV .....	13
<b>FIGURA 5.</b> Pirâmide de prevalência do HPV .....	18
<b>FIGURA 6.</b> Reação em Cadeia da Polimerase .....	29
<b>FIGURA 7.</b> Padrão eletroforético do DNA genômico extraído das amostras cervicais .....	41
<b>FIGURA 8.</b> Prevalência da infecção do HPV diagnosticado pela PCR ...	42
<b>FIGURA 9.</b> Amplificação pela PCR das amostras de material cervical pelos marcadores MY09/MY11, indicando ausência e presença do HPV .....	43
<b>FIGURA 10.</b> Prevalência do <i>primer</i> MY09/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	45
<b>FIGURA 11.</b> Gel de Agarose corado com brometo de etídio de produto amplificado pelos marcadores GP5+/GP6+, apresentando fragmento de 150pb .....	47
<b>FIGURA 12.</b> Gel de Poliacrilamida corado por prata de produto amplificado pelos marcadores GP5+/GP6+, apresentando fragmento de 150pb .....	47
<b>FIGURA 13.</b> Prevalência para o <i>primer</i> GP5+/GP6+, em géis de Agarose e Poliacrilamida .....	49
<b>FIGURA 14.</b> Prevalência em géis de Agarose e Poliacrilamida no resultado positivo total ou positivo comum aos dois <i>primers</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIações

$\mu$ L	-	Microlitro
$\mu$ M	-	Micromolar
A	-	Adenina
ATPase	-	Adenosina trifosfatase
C	-	Tirosina
DNA	-	Ácido Dexoribonucleico
dNTP	-	Dexoribonucleotídeo Trifosfato
Early	-	Região Inicial
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
g	-	Gramas
G	-	Guanina
GP	-	Primer da PCR
E2F	-	Família de Complexos de Fatores de Transcrição
EGF	-	Fator de Crescimento Epidérmico
H	-	Hora
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	-	Papilomavírus Humano
Kb	-	Kilo base
L	-	Região Late
Late	-	Genes Tardios ou Região Codificadora Tardia
LCR	-	Região de Controle Longa
M	-	Molar
min	-	Minutos
mM	-	Milimolar
ml	-	Mililitro
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de Magnésio
MY	-	Primer da PCR

NaCl	- Cloreto de Sódio
NCR	Non-Coding Region
NIC	- Neoplasia Intra-Epitelial Cervical
ORF	- Open Reading Frames
Pb	- Pares de base
PCNA	Antígeno Nuclear Celular Proliferante
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase ou Polymerase Chain Reaction
PDGF	- Receptor do Fator de Crescimento Derivado da Plaqueta
PIN	- Neoplasia Intra-Epitelial de Pênis
PRB	- Proteína Supressora de Tumor
RNA	- Ácido Ribonucléico
RPA	- Proteína Replicadora A
rpm	- Rotações Por Minuto
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
seg	- Segundos
T	- Timidina
Taq	- Thermus Aquaticus (Enzima DNA Polimerase )
TBE	- Tampão tris-borato EDTA
Tk	- Timidina Cinase
TLN	- Tampão de Lise Nuclear
Tris	- Reagente de fórmula $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
URR	- Upstream Regulatory Region
VaIN	- Neoplasia Intra-Epitelial de Vagina
VDS	- Sistema de Vídeo Documentação
VIN	- Neoplasia Intra-Epitelial de Vulva

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Em todo o mundo o câncer de colo uterino humano e a segunda causa de morte entre as mulheres. Entre os fatores de risco para o câncer cervical o Papilomavírus Humano (HPV) é o mais importante, estando presente em aproximadamente 100% dos tumores. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o exame mais sensível no diagnóstico do HPV no trato genital feminino, porém análise de fatores como *primers* e géis de leitura utilizado na PCR são escassos e podem influenciar no diagnóstico final da infecção pelo HPV.

**OBJETIVOS:** Avaliar a sensibilidade dos géis de leitura de Agarose e de Poliacrilamida no diagnóstico de HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase em escovado de colo uterino humano, bem como determinar a prevalência do HPV associando os dois pares de *primers* (MY09/MY11 e GP5+/GP6+) e comparar com os resultados de cada primer isoladamente

**MATERIAL E MÉTODO:** Foram estudadas 86 amostras de secreção do colo uterino. A media das idades das pacientes foram de 32 anos e 6 meses. Cada amostra foi submetida a quatro reações de PCR, usando *primers* específicos: MY09/MY11 e GP5+/GP6+ que amplificam regiões L1 conservadas e, em seguida, foram avaliados em gel de agarose a 1,5% e posteriormente visualizados em gel de poliacrilamida a 10% (corados com nitrato de prata). Para a análise estatística foi aplicada a prova de McMenar, o teste z e o índice de Kappa com nível de significância de  $p=0,05$ .

**RESULTADOS:** Das 86 pacientes avaliadas, 14 amostras (16,27%) foram positivas em MY09/MY11 no gel de agarose e 20 (23,25%) foram positivas no gel de poliacrilamida, sendo que este gel detectou todas as amostras positivas no gel de agarose e mais seis novas. Com o *primer* GP5+/GP6+ 15 amostras (17,44%) foram positivas em gel de agarose e 38 amostras (44,18%) foram positivas em gel de poliacrilamida, sendo que este detectou todas as amostras do gel de agarose e mais 23 novas amostras. A prevalência usando a associação dos dois *primers* em gel de agarose foi de 31,39% com 27 amostras positivas, porém a prevalência total foi de 48 amostras positivas (55,81%), sendo este dado obtido com associação dos dois pares de *primers* em gel de poliacrilamida.

**CONCLUSÕES:** O gel de poliacrilamida foi melhor que o gel de agarose tanto no *primer* GP+-PCR, quanto no *primer* MY-PCR para diagnóstico do HPV. A associação dos *primers* GP+-PCR e MY-PCR aumentou a positividade do diagnóstico do HPV pela PCR nos dois géis de leitura utilizado.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** Cancer of the uterine cervix is the second cause of death among women worldwide. Among the risk factors for cervical cancer, human papillomavirus (HPV) is the most important one, being present in approximately 100% of the tumors. The polymerase chain reaction (PCR) is the most sensitive test for the diagnosis of HPV in the female genital tract, but factors such as primers and detection systems may affect PCR results, and the final diagnosis of HPV infection.

**OBJECTIVES:** To evaluate the sensitivity of agarose and polyacrylamide gels in the diagnosis of HPV by PCR in smears from the human uterine cervix, to determine the prevalence of HPV by combining the two pairs of primers (MY09/MY11 and GP5+/GP6+), and to compare the results with those obtained with each primer separately.

**MATERIAL AND METHOD:** Eighty-six samples of cervix secretion were studied. Mean patient age was 32 years and 6 months. Each sample was submitted to four PCR procedures using the specific primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ which amplify conserved L1 regions. and then evaluated on 1.5% agarose gel ( stained with Ethidium bromide and visualized under the UV light ) and later visualized on 10% polyacrylamide gel (stained with silver nitrate). Data were analyzed statistically by the McMenar test, the z test and the Kappa index, with the level of significance of  $p = 0.05$ .

**RESULTS:** Of the samples from the 86 patients evaluated, 14 (16.27%) were positive to MY09/MY11 on the agarose gel and 20 (23.25%) were positive on the polyacrylamide gel, which detected all the samples that were positive on the agarose gel plus six new ones. With the GP5+/GP6+ primer, 15 samples (17.44%) were positive on agarose gel and 38 (44.18%) were positive on polyacrylamide gel, which detected all the samples that were positive on the agarose gel plus 23 new ones. When the two primers were used in combination, the prevalence was 31.39% on agarose gel with 27 positive samples, but the total prevalence was 48 positive samples (55.81%), obtained with the combination of the two pairs of primers on polyacrylamide gel.

**CONCLUSION:** The polyacrylamide gel presented greater resolution on than the agarose gel system with both sets of primers, GP+ and MY, for the HPV detection. The combination of both markers and gel systems increased HPV prevalence.

## **I. INTRODUÇÃO**

## Caracterização do Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus é um vírus de ácido dextroribonucleico (DNA) com seu genoma correspondente a 12% de seu peso, sendo constituído por molécula única de DNA com dupla fita, circular, super-retorcido. Tem o tamanho aproximadamente de 7,9Kb e peso molecular de  $5 \cdot 10^6$  Daltons (FUCHS *et al.*, 1986; CARR & GYORFI, 2000). Dentro de comprimento relativamente pequeno de DNA transcreve proteínas de ácido ribonucleico (RNA), controlando a proliferação e a diferenciação de células do hospedeiro, bem como codifica proteínas estruturais que formam o capsídeo viral do vírion intacto (McGLENNEN, 2000).

O HPV é um parasita intranuclear obrigatório, normalmente episomal, tendo tropismo específico pelos queratócitos (CHEAP & LOOI, 1998). Apenas os vírus que se integram ao núcleo da célula hospedeira para se reproduzir é que assume o controle genético celular e pode provocar transformação maligna na célula infectada (SEDLACEK, 1999).

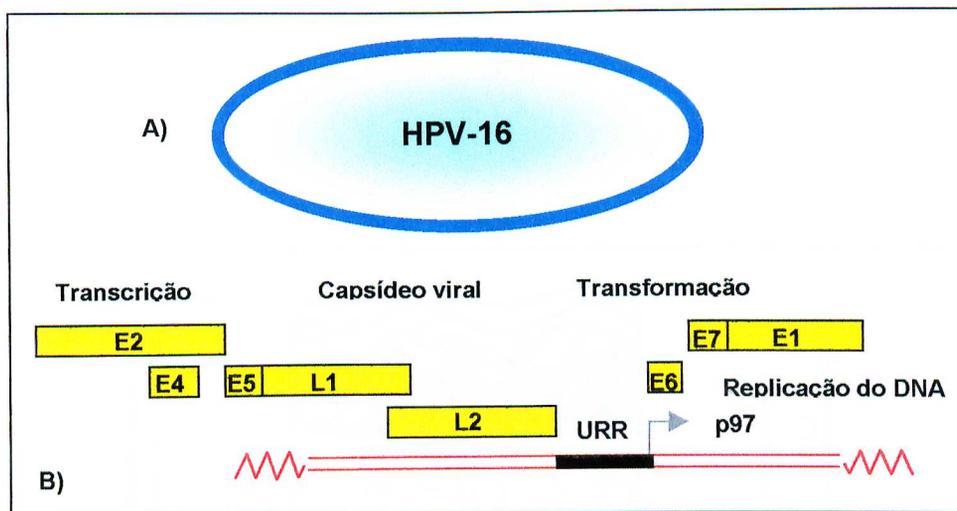
O HPV é classificado de acordo com a estrutura do capsídeo e constituição de seu DNA. Dessa forma, o papilomavírus humano pertence à família *Papovaviridae* e ao gênero *Papillomavirus* (VILLA, 1997). Os membros desta família têm uma estrutura comum: são todos pequenos com dupla fita de DNA que replica nos núcleos, tendo cápsula protéica icosaédrica (STOLER, 2000). Existem aproximadamente 83 tipos de HPVs definidos. Ao contrário dos outros vírus que são classificados pelas características antigênicas, a tipagem do HPV é baseada na sua composição genômica (STOLER, 2000). Dessa forma, aproxima-se de 150 tipos identificados pela reação em cadeia da

polimerase (PCR) que necessitam de melhor definição com uma avaliação completa dos seus genomas (**CARR & GYORFI**, 2000).

A definição de um novo tipo de HPV é realizada quando o DNA viral tem três características fundamentais: (1) tem aproximadamente 7900 pares de base; (2) apresenta-se circular fechado com dupla fita de DNA; (3) tem menos que 90% de homologia na região L1 de um tipo já conhecido. Ambas as fitas são seqüenciadas para evitar erros (**ARENDS, BUCKLEY & WELLS**, 1998; **CARR & GYORFI**, 2000). A determinação de um subtipo é estabelecida quando se tem de 90% a 98% de homologia com um tipo conhecido e a variante quando se tem mais de 98% de homologia (**SOUTHERN & HERRINGTON**, 1998).

Funcionalmente, o DNA do HPV é organizado em seqüências codificantes, também chamadas *open reading frames* (ORF) que são agrupadas em duas regiões (inicial e tardia) separadas por uma pequena seqüência não codificante ou *upstream regulatory region* (URR) ou *non-coding region* (NCR) ou também denominada de região de controle longa (LCR) (**ZUR HAUSEN**, 1996). As seqüências codificantes contêm o controle para a replicação e expressão genética do HPV (**SYRJÄNEN**, 1987). A região de controle longa (LRC) tem aproximadamente 1Kb de comprimento, possuindo seqüências de DNA responsáveis pelo maior estímulo na transcrição viral (p97 no caso do HPV 16) e tem proteínas derivadas do DNA viral que regulam o tipo e a quantidade de RNA viral (**McGLENNEN**, 2000). Os papilomavírus parecem compartilhar uma organização genética semelhante, apesar de haver diferenças nas funções dos genes virais individuais. O tipo HPV genital mais

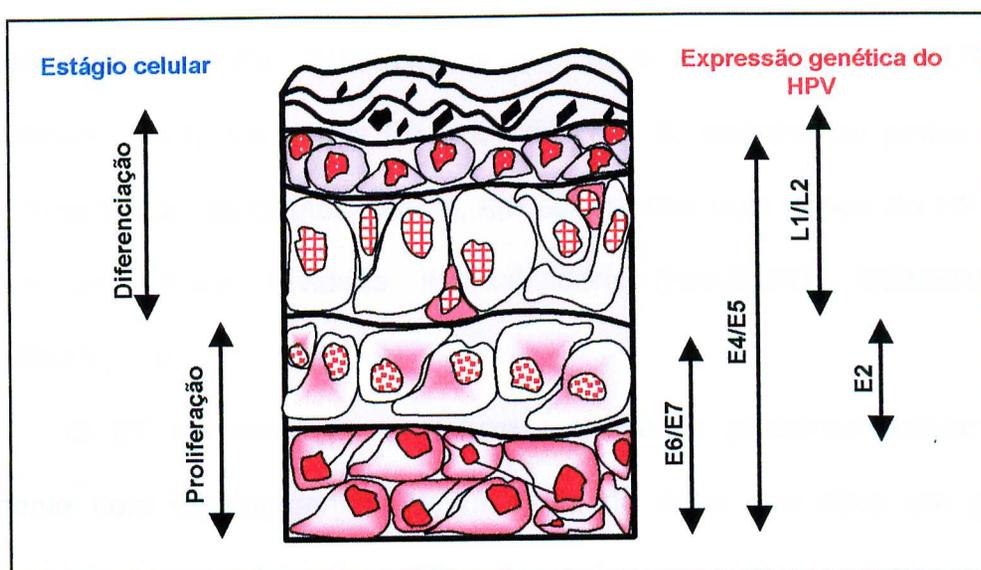
comumente associado com o carcinoma genital, o HPV 16, tem sido mais estudado (Figura 1).



**FIGURA 1.** Estrutura do genoma do HPV 16. (A) Na lesão cervical benigna e pré-maligna, persiste como DNA circular não integrado à célula hospedeira. (B) No carcinoma cervical, integra-se ao DNA da célula hospedeira (LORINCZ & REID, 1997).

No início do processo de infecção, os genes da região inicial (*early*) que correspondem a 45% do genoma viral são expressos através de promotores localizados na região LCR, antes mesmo da replicação do DNA. A replicação e a expressão do DNA viral são controladas pelos genes *early* através de seus produtos com funções específicas (PFISTER & FUCHS, 1987). Os genes tardios (*late*), segundo os mesmos autores, codificam proteínas estruturais da partícula viral. A transcrição tardia dos genes está intimamente

ligada ao programa de diferenciação das células epiteliais escamosas ou ceratinosas. A expressão dos genes L1 e L2 é observada apenas em células maduras das camadas superiores da pele ou do epitélio escamoso, embora o DNA do vírus possa ser encontrado em células parabasais (Figura 2).



**FIGURA 2. Expressão dos genes do HPV no epitélio cervical (McGLENNEN, 2000).**

As seqüências de codificantes iniciais comuns em todos os HPVs são oito (E1-E8) (CHEAP & LOOI, 1998). Elas têm uma grande importância no mecanismo de replicação e controle transcricional viral, alteram os padrões de crescimento das células infectadas e modulam a divisão celular. Dessa forma,

acredita-se que a expressão destas seqüências está intimamente relacionada com o potencial oncogênico destes vírus (**DANOS *et al.*, 1984**).

As proteínas E6 e E7 do HPV 16 têm atividade de transformação celular e de modular a replicação viral, apresentando uma atividade cooperativa no estabelecimento e na manutenção da duração estendida de vida, ou seja, no processo de “imortalização”. Promovem alteração no padrão de diferenciação dos queratócitos cervicais que são células-alvo do HPV (**MÜNGER *et al.*, 1989**; **HUDSON *et al.*, 1990**; **HALBERT, DEMERS & GALLOWAY, 1991**). Os genes E6 e E7 do HPV 6, isolados ou juntos, não podem “imortalizar” as células; porém, em associação com genes do HPV 16 mostram uma fraca atividade imortalizadora (**HALBERT, DEMERS & GALLOWAY, 1992**).

O E7 faz interação complexa com várias proteínas celulares e juntamente com E6 compartilha de uma via de ação que ativa um grupo importante de genes celulares, codificando enzimas e proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (**TUREK & SMITH, 1996**).

A invariável presença e persistência dos genes E6 e E7 do HPV em tumores define a importância de investigar o papel de transformação neoplásica desencadeada por estes genes. Outro fator é a capacidade de “imortalizar” células epiteliais causadas pelas proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco, o que não é notado com as mesmas proteínas dos HPVs de baixo risco (**McGLENNEN, 2000**).

A proteína E7 pertence à classe dos fatores de transcrição de DNA (**McGLENNEN, 2000**). Sua ação é dissociar o complexo pRB(p105) do fator de

transcrição E2F que existe nas fases G0 e G1 do ciclo celular (**CHELLAPPAN et al.**, 1992; **PAGANO et al.**, 1992). Este processo é devido à fosforilação do pRB e como consequência, liberação e ativação da E2F, resultando em estímulos mitóticos celulares (**ZUR HAUSEN**, 1999). Os complexos ativos E2F consistem em dímeros formados por membros de duas famílias de proteínas parcialmente relacionadas, E2F-1 até E2F-5 e DP-1 até DP-4 (**WEINBERG**, 1995 e 1996). A ação do complexo pRB-E2F é inibir genes alvos dependentes do E2F; assim não ocorre a transcrição que este fator estimula isoladamente (**WEINTRAUB, PRATER & DEAN**, 1992; **WEINTRAUB et al.**, 1995). Com a liberação de E2F, ocorre a ligação e a ativação de genes celulares ciclo-reguladores como a polimease  $\alpha$ -DNA; enzima para a síntese dos precursores nucleotídios como a timidina cinase (tk); os fatores de replicação celular de DNA como a proteína replicadora A (RPA) e o antígeno nuclear celular proliferante (PCNA); os fatores celulares que mediam a resposta aos estímulos de crescimento como c-Myb, c-Myc e o N-Myc e finalmente algumas ciclinas que regulam a progressão do ciclo celular (**GENG et al.**, 1996). Dessa forma, a expressão dos genes celulares ativados pelo E2F são suficientes para induzir células quiescentes a entrarem na fase S de mitose e isto coincide com sua capacidade de estimular a transcrição (**JOHNSON et al.**, 1993). O complexo formado pelo E7-pRB impede que o pRB se ligue ao DNA, prejudicando a sua capacidade de inibir o crescimento celular (**STIRDIVANT et al.**, 1992). O E7 tem como alvo vários outros locais de ação relacionados com o ciclo celular; por exemplo: interage com fatores de transcrição celular como AP-1 (**LAZO**,

1999), descartando a hipótese de que a formação complexa com pRB não seja nem necessária nem suficiente para a oncogenicidade.

Atualmente, propõe-se um novo mecanismo de transformação celular mediado pelo E7, uma vez que o HPV usa a ativação da síntese celular de DNA por esta proteína para sua replicação. Assim, tem-se duas vias possíveis: a primeira envolve associação com complexo cyclin-CDK e outros fatores dependentes da fase S da mitose; o segundo mecanismo é a facilidade do E7 de suprimir a função do pRB através de sua desestabilização ou ligando-se a ele como já descrito (**PONTEN & GUO, 1998; McGLENNEN, 2000**).

A proteína codificada pelo gene E6 tem sua principal função na ligação e na inativação do p53; esta associação induz a degradação ubiquitin-dependente do p53, proporcionando um aumento na atividade transcricional e uma diminuição da proliferação celular (**VILLA, 1997; THOMAS, PIM & BANKS, 1999**). Isto resultaria em um importante distúrbio no papel regulador de reparo ao DNA lesado e na regulação da transcrição celular. Como consequência, ocorreria o acúmulo de lesões genéticas que levariam à progressão tumoral (**ZUR HAUSEN, 1999**). Esta integração entre E6 e p53 é importante na criação e na progressão da maioria das lesões cervicais (**SPANDIDOS *et al.*, 2000**). A função do p53 é de monitorizar o estado do genoma celular, fazendo reparo do DNA lesado, detectando células na fase G1 que entrarão em replicação. Se a lesão ao DNA for intensa, ocorre parada do ciclo celular ou apoptose celular antes da sua replicação mediada pelo p53 (**McGLENNEN, 2000**). A ligação do E6 ao p53 suprime esta repressão (**LECHNER *et al.*, 1992**). O E6, juntamente com outra proteína celular, a E6-

AP, formam um complexo ternário com o p53 que é degradado pela via proteolítica do peptídeo ubiquitin (**SCHEFFNER *et al.*, 1993**). O E6 apresenta ação independente da p53 que evita a indução de morte celular programada ou apoptose (**XIONG *et al.*, 1996**). Por exemplo, pela via de ativação da telomerase em que o E6 tem-se mostrado um *upregulation* na sua atividade, formando um complexo de ribonucleoproteínas responsáveis pela síntese das seqüências de repetição do telômero que está ligado com a “imortalização” celular característica da maior parte dos tumores (**KLINGELHURTZ, FOSTER & McDOUGALL, 1996**).

A diferença na replicação do HPV de alto e baixo risco está na maior efetividade em que o E6 liga-se ao p53, isto porque a interação ocorre em diferentes locais de replicação. O HPV de baixo risco replica-se unicamente no nível mais baixo do epitélio estratificado onde os queratócitos podem resistir à divisão celular. Já o HPV de alto risco replica nos níveis mais altos de epitélio onde os queratócitos estão inteiramente envolvidos em processo de diferenciação terminal. Portanto, os HPVs de alto risco necessitam que sua proteína E7 tenha maior modulação à indução da síntese de DNA e por consequência requerem que E6 tenha mais efetividade sobre a diminuição de resposta do p53 (**THOMAS, PIM & BANKS, 1999**).

Os esquemas para estes mecanismos encontram-se na Figura 3.

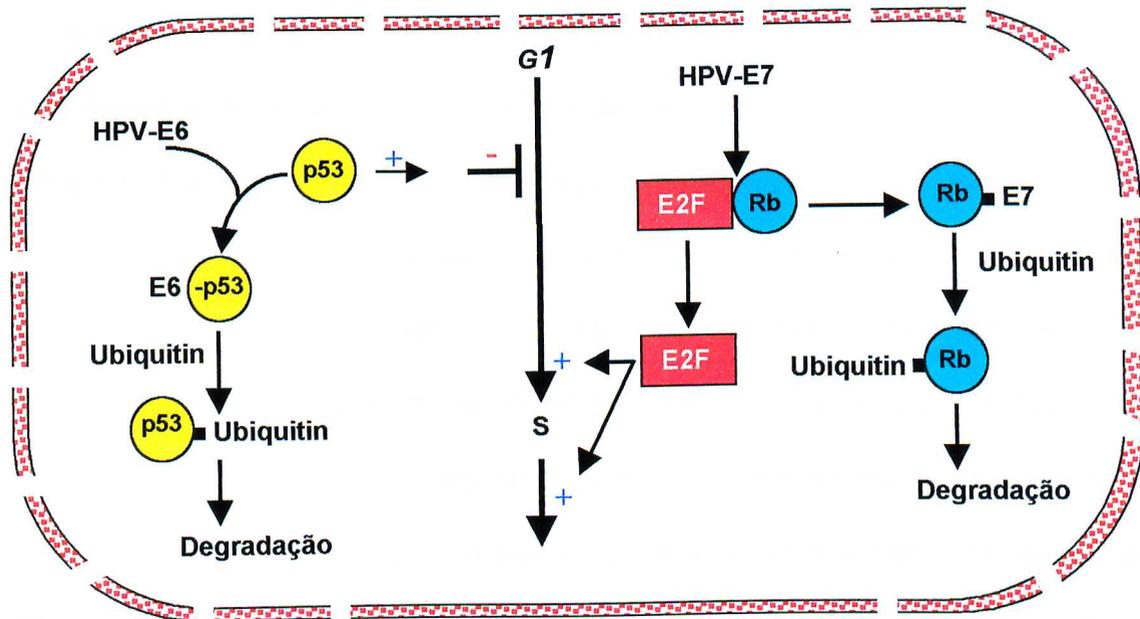


Figura 3. Ação do E6 e E7 na célula hospedeira (LAZO, 1999).

O gene E5 codifica polipeptídios altamente hidrofóbicos ancorados na membrana celular, como também interage e modula as funções de outras proteínas ligadas à membrana. É possível que induza proliferação celular durante a fase inicial da infecção viral (ZUR HAUSEN, 1996). Age no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), nos queratócitos, no receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), nos fibroblastos e promove uma associação ao receptor, retardando a sua remoção e degradação (STRAIGHT *et al.*, 1993).

O E5 induz hiperplasia epitelial típica nas lesões de HPV *in vitro*. Ele, isolado, não transforma células primárias, mas coopera efetivamente com outras proteínas virais. A promoção da sua proliferação celular pode aumentar

o risco de acumular defeitos genéticos nas células hospedeiras pela integração do genoma viral e por acionar os genes E6 e E7 do HPV (McGLENNEN, 2000). Dos genes virais envolvidos na replicação do HPV, a proteína E2 completa é ativadora transcricional que potencializa a replicação viral do DNA e confere especificidade na ligação cooperativa do E1 ao *ori* próximo a E6 (SEDMAN & STENLUND, 1995). Esta promove a replicação viral logo após a penetração do vírus na célula (SALAS & BAYGHEN, 1995). O gene E2 codifica duas proteínas com função de regular processos transcricionais: uma proteína completa que é um positivo regulador na terminação N e outra de ligação ao DNA que funciona como repressora na terminação C, sendo que a importância clínica do E2 está relacionada com pior prognóstico e menor sobrevida livre de doença do paciente (LAZO, 1999).

A proteína E1 tem atividade ATPase (Adenosina trifosfatase) helicase desdobradora de DNA (BREAM, OHMSTEDE & PHELPS, 1993). Ela inicia e controla o local da replicação do genoma viral (McGLENNEN, 2000). A integração entre o HPV e a célula, que pode ocorrer em múltiplos locais, tipicamente envolve parcial deleção de E1 e E2, mas sem efeito em E6 e E7 (SANCHEZ PERES *et al.*, 1997).

A região codificante tardia (*late*) compreende 40% do genoma viral e tem uma organização mais simples do que a inicial. Contém dois segmentos: a região codificadora da proteína L1, gênero-específico, maior, que compreende mais de 90% da proteína viral, sendo o componente principal do capsídeo; a região codificadora da proteína L2, tipo-específico, menor, sendo um componente menos abundante no capsídeo e responsável pela replicação viral

(**BENSON**, 1996). A L1 é conservada entre as espécies humana e animal, sendo altamente imunogênica e muito heterogênea (**McGLENNEN**, 2000). Na maioria dos condilomas acuminados analisados, os antígenos virais capazes de provocar resposta imunitária são codificados por L1 (**SYRJÄNEN**, 1987). A região L1 é freqüentemente usado para tipagem do HPV e codifica antígenos alvos dos anticorpos usados em detecção imunohistoquímica dos produtos da infecção por HPV (**SOUTHERN & HERRINGTON**, 1998).

A região de controle longa (LRC) está localizada entre as porções terminais da região tardia e a E6, compreendendo entre 400 a 900 pares de bases. Corresponde a cerca de 10% do genoma viral, sendo responsável por regular a replicação e pela expressão gênica do HPV. Esta é a região mais heterogênea do vírus (**MAJEWSKI & JABLONSKA**, 1997).

### **Epidemiologia do HPV**

Informações epidemiológicas dos HPVs são de difícil avaliação devido a vários fatores: um grande número de casos subclínicos, não crescem em tecidos de cultura, não pode ser transmitido para animais em laboratório e, finalmente, não causa uma doença de notificação compulsória (**KOUTSKY**, 1997; **STOLER**, 2000).

Estes vírus estão comumente no epitélio de diferentes animais vertebrados, incluindo aves, répteis e mamíferos, sendo altamente específicos para seus respectivos hospedeiros e induzindo, ainda que não exclusivamente, neoplasias epiteliais escamosas (**VILLA**, 1997; **STOLER**, 2000). Em quase

todos os tecidos, encontram-se lesões com a presença de HPV. Certos tipos preferem infectar o epitélio cutâneo e outros, o epitélio mucoso. Na região anogenital de homens e mulheres infectados, o efeito destes vírus se torna mais expressivo, principalmente no epitélio escamoso do colo uterino, pelo qual o vírus tem um grande tropismo com forte associação às lesões de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e de câncer cervical (CARR & GYORFI, 2000).

Após um contato sexual, a infecção pelo HPV pode tomar vários caminhos, dependendo de fatores de risco associados como na Figura 4. O maior fator de risco epidemiológico para infecção é o número de parceiros sexuais, ou seja, a promiscuidade tanto da mulher como do seu parceiro(VILLA, 1997; STOLER, 2000).

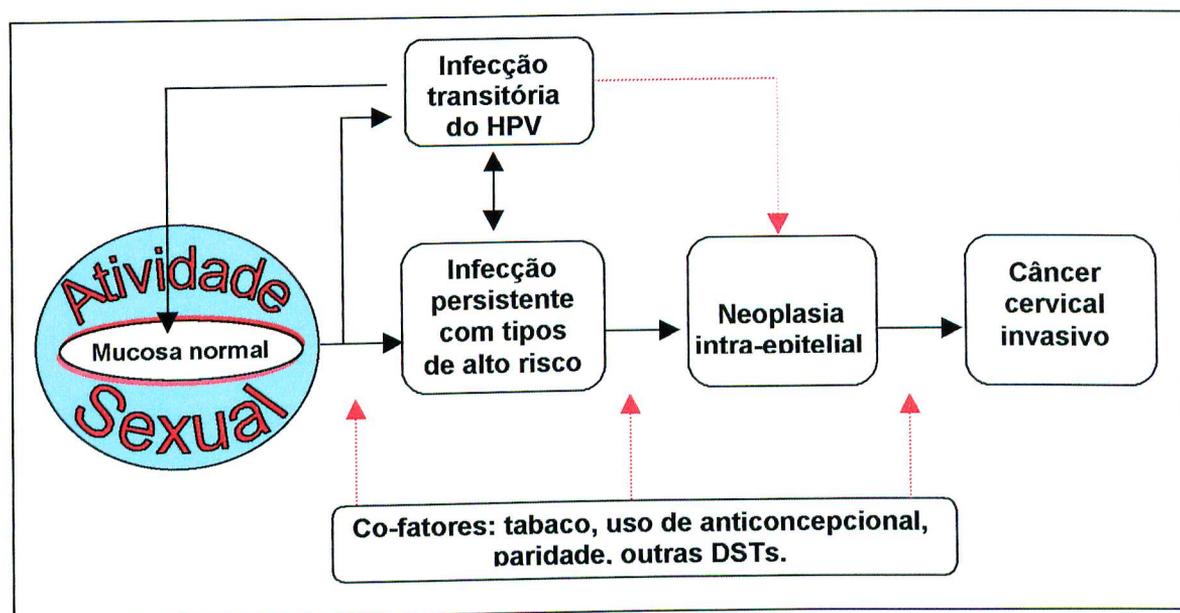


FIGURA 4. Patogenia do HPV (VILLA, 1997).

Vários tipos de HPV associam-se a diversas lesões na região anogenital feminina. As lesões cervicais que apresentam o tipo HPV 16 têm alto risco para progredir até carcinoma *in situ*, assim como sugere-se que o HPV 18 aumente significativamente o risco de adenocarcinoma de colo uterino (McLACHLIN, 2000). Por outro lado, uma infecção primária por HPV poderá regredir espontaneamente em até 60% dos casos, não desenvolvendo lesões de baixo e/ou alto grau, bem como carcinoma (KAUFMAN & ADAM, 1999). Os HPVs 6 e 11 estão presentes em 90% dos condilomas genitais, sendo o HPV 6 responsável por 2/3 das lesões e o HPV 11 pelo terço restante (SOUTHERN & HERRINGTON, 1998).

As principais lesões com os respectivos tipos de HPV implicados estão na Tabela 1.

**TABELA 1. Tipos de HPV associados a lesões anogenitais.**

<b>Lesões</b>	<b>Tipo de HPV</b>
Verrugas genitais (condiloma exófilo)	6, 11
Condiloma plano	6, 11, 16, 18, 31
Neoplasia intra-epitelial cervical (NIC)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56
Doença de Bowen	16
Tumores Buschke-Löwenstein	6, 11
Neoplasia intra-epitelial vulvar e carcinomas	16 [raramente 6, 11]
Câncer Cervical	
Alto risco	16, 18
Moderado risco	31, 33, 35, 45, 51, 52, 56
Baixo risco	6, 11, 42, 43, 44
Neoplasia intra-epitelial peniana e carcinomas	16, 18
Neoplasia intra-epitelial anal e carcinomas	16 [raramente 6, 11, 18, 33]

As lesões são mais comuns em prostitutas e mulheres de homens que têm atividade sexual com várias parceiras; além do que, mulheres de homens que têm câncer de pênis apresentam maior risco de desenvolverem câncer cervical, sugerindo uma causa comum para estas patologias (McLACHLIN, 2000).

Estudos mostram que o HPV 18 tem alta associação com adenocarcinoma, quando comparado com HPV 16. Especula-se que o HPV 18 é um vírus agressivo e predispõe a um rápido desenvolvimento de neoplasia cervical, sendo um fator prognóstico negativo com relação à sobrevida do

paciente portador. Assim, a triagem para este tipo viral poderia ter importância preventiva (McLACHLIN, 2000).

HPVs genitais são divididos em grupos de maior ou menor agressividade, baseados na frequência com que se associam aos tumores e no seu potencial oncogênico presumido ao estarem presentes ou ausentes em lesões de carcinoma *in situ* ou câncer cervical (STOLER, 2000). Os principais vírus implicados em lesões de alto risco são os HPVs 16, 18 e 45 e os de baixo risco são os HPVs 6 e 11, sendo os outros de risco intermediário. Os HPVs de baixo risco seriam o tipo isolado em lesões benignas, principalmente em verrugas genitais, e os de alto risco estão associados aos diferentes graus de NIC, à neoplasia intra-epitelial de vulva (VIN), de vagina (VaIN) e de pênis (PIN), bem como ao câncer cervical (VILLA, 1997).

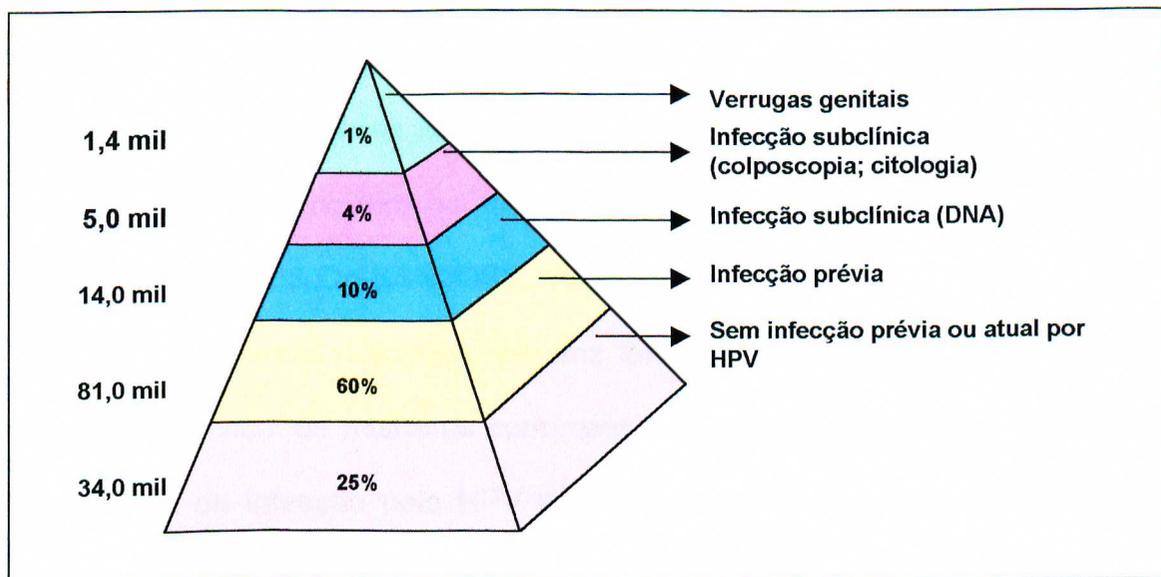
A transmissão do HPV requer contato direto com o vírus. Durante os anos 40, foi comprovada a sua transmissibilidade sexual. Após a injeção de extratos de verrugas genitais em presos voluntários, ocorreu, em seguida, o aparecimento de lesões. Na guerra da Coréia, foi confirmada a natureza venérea das verrugas genitais, uma vez que mulheres de soldados americanos apareceram com lesões genitais, após contato com pênis infectados dos parceiros que retornaram da guerra. A exposição durante o intercuro sexual é a maneira mais comum de adquirir HPV. A transmissão vertical durante o parto tem sido documentada, porém a frequência em que ela ocorre permanece sem documentação, bem como a transmissão por contatos com objetos inanimados tem sido relacionada sem nenhuma comprovação (SEDLACEK, 1999).

A positividade do HPV é de sete a 10 meses, sendo que em um ano ocorre eliminação do HPV em 2/3 das mulheres positivas, com os vírus persistentes provavelmente de alto risco (PONTEN & GUO, 1998). A persistência da infecção por HPV de alto risco esta relacionada com lesões que evoluem para câncer, o que não se observa com a presença de HPV de baixo risco ou na ausência do DNA de HPV no colo uterino (VILLA, 1997).

### **Prevalência de HPV**

A análise da prevalência da infecção pelo HPV no aparelho genital é complexa. Estima-se que de 10% a 15% da população sexualmente ativa entre 18 anos e 28 anos está contaminada; todavia, a vasta maioria das infecções são subclínicas com aproximadamente 1% evidenciando verrugas genitais e em apenas 4% a citologia está alterada. O agravante é que uma mesma mulher pode ser contaminada com mais de um tipo viral durante sua vida (McLACHLIN, 2000). Pacientes assintomáticas ou com neoplasias intra-epiteliais ou com câncer cervical podem apresentar infecções virais múltiplas (CHANG *et al.*, 1997). Em outro estudo, a prevalência do HPV varia de 5% a 30% nas mulheres sexualmente ativas, sendo que 1/3 delas tem mais de um tipo de HPV quando se usa o PCR no diagnóstico viral. A maioria das infecções é transitória, sendo que nas situações em que o HPV persiste podem ocorrer lesões de baixo grau um a dois anos após o contato primário. Em mais de 1/3 das mulheres infectadas com HPV 16 e 18 desenvolvem-se lesões de alto grau (COUTLEE *et al.*, 1997).

A prevalência encontra-se esquematizada na Figura 5.



**FIGURA 5. Pirâmide de prevalência do HPV (SEDLACEK, 1999).**

No aparelho genital, aproximadamente 1% da população americana com atividade sexual tem verrugas genitais. Porém, a estimativa verdadeira é difícil devido às variáveis que interferem no diagnóstico como: população estudada, sensibilidade e especificidade dos testes usados para a detecção e o número de técnicas utilizadas no diagnóstico, bem como a otimização de laboratórios para exames específicos que, em um contexto geral, poderia mudar os dados estatísticos analisados. Apesar destas variáveis, estima-se que entre homens e mulheres com idade de 15 a 49 anos, 20% têm evidência molecular de infecção por HPV (CARR & GYORFI, 2000). Estudo de coorte

realizado em São Paulo, indicou 1,3% de novas infecções por mês com acumulado de 38% de positividade após 18 meses (**FRANCO et al.**, 1999).

O câncer cervical é a segunda neoplasia mais freqüente entre as mulheres, superada apenas pelo câncer de mama. Em países em desenvolvimento, é o mais comum entre as mulheres. Estima-se que mais de 200.000 mulheres morrem no mundo de câncer de colo de útero por ano (**BOSCH, MUÑOZ & De SANJOSE**, 1997).

Em países europeus, há uma tendência ao aumento na incidência de câncer cervical de mulheres com menos de 50 anos, apesar de diminuir a prevalência da infecção pelo HPV após 30 anos, independente da atividade sexual. A diminuição da infecção poderia ser correlacionado com o desenvolvimento de uma eficiente resposta imunológica contra o vírus (**COUTLEE et al.**, 1997). Esta resposta é feita pela reação de anticorpos, tanto para tipos específicos de vírus quanto para partículas virais, sendo mais freqüente em mulheres acima de 30 anos. Isto não é observado em mulheres que desenvolvem neoplasia cervical (**TACHEZY et al.**, 1999).

Um estudo multicêntrico de 22 países, observando a prevalência de HPV e câncer cervical em mais de 1.000 amostras, encontrou 93% de tumores com DNA de HPV. O HPV 16 foi encontrado em 50% das amostras, sendo o tipo predominantemente detectado em 21 dos 22 países. O HPV 18 foi o tipo mais evidente na Indonésia. Os HPVs 18, 45 e 31 foram encontrados em 14%, 8% e 5% das amostras, respectivamente (**BOSCH et al.**, 1995). Na Austrália, a prevalência de infecção do HPV em paciente com câncer de colo uterino foi de 91,9% da população estudada, sendo o HPV 16 o mais comum com 53,8% das

amostras positivas (**CHEN et al.**, 1999). Na América do Norte e Europa, o HPV 16 é o tipo mais comum entre os de alto risco (**GOODMAN**, 2000). No Brasil, em Belém do Pará, a prevalência de positividade para o HPV foi de 70% em pacientes com carcinoma escamoso ou adenocarcinoma invasivo de colo uterino, 63% em pacientes com neoplasia intra-epitelial graus dois e três e 36,8% em cervicite crônica. O HPV 16 foi encontrado em 60,4% e 54,5% nos dois primeiros grupos e os HPVs 16, 18, 33 foram encontrados em 71,4% dos pacientes com NIC (**NORONHA et al.**, 1999). Estudo realizado em Belo Horizonte, usando hibridização *in situ* com sondas de DNA biotinizadas de HPVs 6, 11, 16 e 18, mostrou que 14% dos casos de displasia leve/moderada foram positivos para HPVs 6 e 11 e 7% para HPV 16; no grupo de displasia acentuada/carcinoma *in situ*, 31% tinham DNA de HPV 16 ou 18 e 20% dos carcinomas invasores foram positivos para HPV 16 ou 18 e 73% dos condilomas acuminados positivos para os HPVs 6 e 11 (**GUIMARÃES, BRASILEIRO FILHO & PENA**, 1992). Dessa forma, o HPV torna-se o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical seguido de outros como: idade precoce ao primeiro coito, múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, uso de anticoncepcional oral e parceiros com múltiplas relações principalmente com prostitutas (**JIN, CASH & KENNEDY**, 1999). O prognóstico de câncer invasivo de colo uterino é dependente do potencial oncogênico do tipo de HPV associado (**LOMBARD et al.**, 1998). Em áreas que prevalecem os tipos virais de baixo risco oncogênico as mulheres infectadas não desenvolvem lesões cervicais graves (**VILLA**, 1997).

Em um estudo de caso-controle, evidenciou-se que mulheres positivas para HPV têm 3,8 vezes mais chance de desenvolver NIC 1 e 12,7 vezes mais chance de desenvolver NIC 2 e NIC 3 em relação a mulheres que são negativas para HPV (LIAW *et al.*, 1999). As lesões pré-malignas (NIC) podem progredir para carcinoma invasivo em 1,4% e para carcinoma *in situ* em 14%, enquanto que 36% dos carcinomas *in situ* evoluem para câncer invasivo, sendo que o tempo desta progressão estaria estimado entre 10 anos e 15 anos (SURIS, DEXEUS & LOPES-MARIN, 1999).

Evidências na citologia têm apontado para o fato de que a infecção por HPV sofre um drástico decréscimo em sua prevalência com o aumento da idade, uma vez que a maioria das infecções resolve-se espontaneamente. Porém, aquelas que persistem são mais comumente causadas por tipos virais de alto risco e têm maiores chances de progredir para lesões cervicais graves (REMMINK *et al.*, 1995; SEDLACEK, 1999), principalmente se ocorrer alta carga viral simultaneamente, definindo a importância do teste de HPV no acompanhamento das mulheres com NIC (HO *et al.*, 1995).

Recentemente, tem-se analisado o efeito da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) concomitantemente com infecção por HPV e câncer cervical, sendo que as mulheres HIV soropositivas têm uma prevalência cinco vezes maior de desenvolverem NIC que as mulheres soronegativas (SURIS, DEXEUS & LOPES-MARIN, 1999). Outro estudo mostrou não apenas maior incidência de neoplasia intra-epitelial cervical e câncer como um tempo menor de sobrevida para doença invasiva. Pacientes com contagem de linfócitos CD4 menor do que  $500 \times 10^6/L$  têm alta incidência de NIC com severa

displasia (**HANKINS, COUTLEE & LAPOINTE**, 1999). Outros estudos mostram que estes efeitos também podem ser observados em transplantados renais com imunodeficiência.

### **Mecanismo de infecção do HPV**

Ao penetrar no organismo, o vírus inicia o processo infeccioso nas células da camada basal e produz duas mudanças epiteliais relevantes. A primeira alteração ocorre na maturação celular que termina em células diferenciadas, incluindo a atipia com coilocitose. Este processo é importante, produzindo células incapazes de se dividirem. A segunda mudança ocorre em anormalidades das características de crescimento e diferenciação do epitélio, produzindo alterações na replicação das células basais e parabasais que refletem em distúrbios morfológicos em todas as camadas celulares. Estas alterações são mediadas via HPV (E6, E7), alterando as funções dos ciclos genéticos das células e mostrando a relação positiva entre HPV e câncer de colo uterino (**CRUM**, 2000).

O DNA do vírus, através de microtraumas e/ou quando exposto aos epitélios imaturos ou metaplásicos (preferidos pelo vírus) ou alterados por processo inflamatório, infecta o epitélio escamoso. Inicia sua replicação em células das camadas profundas porque nelas existe toda a estrutura de que o vírus depende para sua reprodução. A entrada do HPV nas células parece ser mediada pela ligação de proteínas do capsídeo viral a receptor celular (**ABRÃO et al.**, 1994).

O vírus do papiloma não produz brotamento a partir da membrana celular, não possuindo, portanto, envelope lipídico; mas possui uma cobertura protéica que lhe permite continuar infeccioso fora das células por algum tempo e ser resistente ao éter (**MELNICK *et al.*, 1974; ANDROPHY, 1989**).

O curso da infecção depende da ação dos componentes virais e do comportamento das células contaminadas permissivas ou não-permissivas, isto é, que permitem ou não a formação de partículas virais completas. Dependendo da interação desses fatores, evolui para infecção latente ou lesão clinicamente visível.

A infecção que ocorre em células permissivas terá replicação limitada, estável e sincrônica do DNA viral. Assim, todas as células-filhas terão um número suficiente de cópias, mantendo a infecção de forma latente (**SMOTKIN, 1989**). Nas células basais, embora seja o local da infecção primária, o genoma viral conserva-se em forma episômica. Com a diferenciação progressiva dos queratócitos, ocorre amplificação do genoma viral e a expressão genética da região *late* (L) com formação de partículas virais completas, alcançando até as camadas superficiais. Esta forma de infecção dá origem aos coilócitos, ao aumento nuclear, à multinucleação, à disqueratose e em alguns casos chegam a lesões de baixo grau que poderão regredir, persistir ou progredir (**SOUTHERN & HERRINGTON, 1998**).

A expressão do gene viral nas células basais infectadas provoca uma resposta de divisão celular anormal. Isto resulta em aumento do número de células germinativas, formação de papilas, hiperplasia da camada espinhosa (acantose) e das células cornificadas (hiperceratose) e

anormalidades na diferenciação celular (paraceratose). Depois desta fase, os vírus são liberados com as células mortas que se descamam (**SMOTKIN, 1989**).

Na infecção que ocorre em células não-permissivas, partículas virais inteiras não são encontradas, pois estas células perdem progressivamente sua capacidade de diferenciação. Isto é o que ocorre nas lesões malignas, sendo que o número de cópias do genoma viral é menor e, geralmente este se encontra integrado ao genoma celular (**REID & CAMPION, 1989**). Esta segunda forma de infecção acontece quando a produção vegetativa viral não ocorre e pode ser encontrada no epitélio escamoso ou glandular. O DNA viral persiste como um elemento integrado ao DNA do hospedeiro com cópia simples única ou com múltiplas repetições em vários sítios frágeis cromossômicos (**SOUTHERN & HERRINGTON, 1998**).

A infecção pelo vírus pode seguir três caminhos: completo clareamento após infecção aguda, forma latente ou infecção ativa e progressiva. Dessa forma, o vírus pode seguir por três cursos diferentes dentro da célula: (1) o DNA viral é mantido intranuclear, extracromossomo e episomal, enquanto replica sincronicamente com a célula hospedeira, produzindo uma infecção latente; (2) conversão de latente para infecção ativa com infectividade viral completa e (3) integração de DNA viral no genoma da célula hospedeira, sendo este o fenômeno visto em infecções associadas à transformação maligna (**CHEAP & LOOI, 1998**).

## Diagnósticos da infecção pelo HPV

O HPV que é espécie-específico não infecta animais de laboratório e não pode ser isolado de amostras clínicas por meio de cultura de células, uma vez que exige diferenciação celular para suas replicações. Assim, não há testes sorológicos adequados para sua detecção. Apesar de partículas virais serem detectadas pela microscopia eletrônica e por técnicas de imunocitoquímica, nenhum destes métodos é suficientemente sensível para identificar as infecções não permissivas – as que não produzem partículas virais completas – além de terem baixa sensibilidade mesmo para as infecções permissivas que produzam poucas partículas, como é o caso das lesões genitais (SCHNEIDER *et al.*, 1987).

Os métodos mais usados para o diagnóstico da infecção pelo HPV são: o exame clínico, evidente no caso de lesões de condiloma acuminado; a colposcopia, vantajosa para lesões subclínicas, principalmente as de colo uterino; a citologia que revela as alterações celulares produzidas pelo vírus e a biópsia que tem melhores resultados quando dirigida pela colposcopia. No entanto, nenhum deles diagnostica as infecções latentes. Devido ao baixo custo e à facilidade de execução, estes métodos são adequados para o rastreamento populacional, apesar de não detectarem nem a infecção latente nem o tipo viral (MURDOCH *et al.*, 1988).

O maior custo benefício entre os indicadores de infecção pelo HPV é o da citologia. Quando os colócitos são vistos com atipias nucleares, hiperqueratose e paraqueratose, a correlação com teste de PCR para HPV tem uma excelente associação. No entanto, a citologia não é inteiramente confiável,

principalmente devido à baixa reprodutividade entre os citologistas nos diagnósticos de lesões de baixo grau (**SEDLACEK**, 1999).

O advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível diagnosticar de maneira mais adequada e sensível a presença do DNA do vírus HPV, essencial para qualquer tipo de infecção (**SCHNEIDER et al.**, 1987). Os avanços nesta área só foram possíveis pela à associação de vários campos do conhecimento científico como a genética, a bioquímica, a virologia e o estudo da molécula do DNA (**SOUTHERN**, 1975).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) é atualmente o método mais sensível para diagnosticar a presença do HPV em colo uterino humano de pacientes infectadas (**QU et al.**, 1997).

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de reação enzimática que detecta quantidades ínfimas de DNA do agente infeccioso sem a necessidade de cultura independentemente da resposta imune do hospedeiro. Esta reação vem mudando profundamente as práticas de pesquisa nas áreas de biologia molecular, genética e medicina. Usando a análise de PCR, pode-se detectar uma pequena molécula de DNA do vírus em  $10^5$  célula do hospedeiro (**ZAZOVE et al.**, 1998).

O método da PCR consiste em processo similar ao de replicação que ocorre em todas as células procarióticas e eucarióticas. Utiliza-se a enzima DNA polimerase que tem um papel fundamental nos processos de reparação e

replicação do DNA (LO & FELDMAN, 1994). A reação é processada ciclicamente em três fases básicas, com duração de três a cinco minutos, realizadas seqüencialmente em um mesmo tubo, havendo variação na temperatura de incubação em cada uma das etapas.

A primeira etapa (desnaturação) é realizada na temperatura de 94°C (ASTORI *et al.*, 1998). Esta temperatura é suficiente para se quebrar as pontes de hidrogênio, liberando duas fitas simples de DNA que podem ser subseqüentemente reaneladas para formarem outro DNA com sua seqüência complementar.

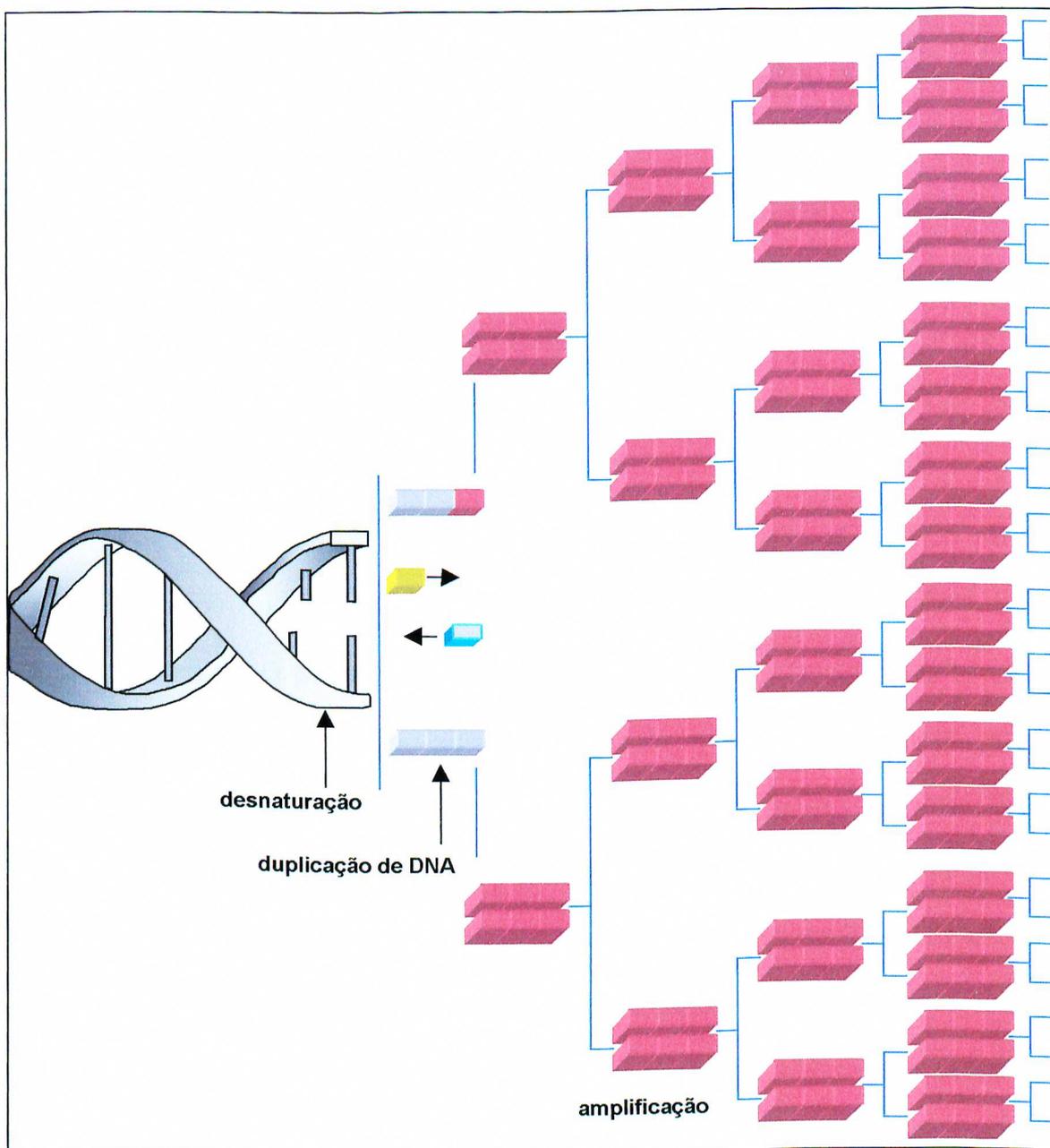
A segunda etapa (anelamento) ou associação dos iniciadores da reação de síntese ao DNA-molde, realiza-se em temperaturas mais reduzidas (50°C a 68°C). Em associação ao DNA-alvo a ser amplificado, dois oligonucleotídios de fita única denominados iniciadores (*primers*) são anelados à seqüência complementar dispostos em oposição à hélice do DNA-alvo, um interna, outro externamente.

A terceira etapa (extensão) ou síntese ocorre a 72°C (ASTORI *et al.*, 1998). Nesta etapa há a participação da enzima Taq polimerase, termoestável, que é proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1988), mediando a amplificação desse fragmento de DNA (EISENSTEIN, 1990). No fim do primeiro ciclo, a quantidade de DNA é duplicada e a expansão de uma determinada seqüência se faz de maneira exponencial, ou seja,  $2^n$  em que  $n$  é o número de ciclos. Dessa forma, o número de produtos longos aumenta aritmeticamente conforme o número de ciclos processados, ou seja, 20 cópias após 20 ciclos; enquanto que os produtos curtos aumentam de forma

geométrica com um milhão de cópias após 20 ciclos, sendo que no final de 20 a 35 ciclos de amplificação, a mistura da reação forma seqüências de DNA detectáveis e analisáveis.

A análise ocorre após um processo de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, corado com brometo de etídio ou prata respectivamente, seguido por exposição à luz ultra-violeta (LO & FELDMAN; 1994; FELDMAN *et al.*, 1997).

Resumidamente, a reação de PCR pode ser vista na Figura 6.



**FIGURA 6. Reação em Cadeia da Polimerase.**

As reações falso-positivas normalmente são causadas pela contaminação do ácido nucléico ocorrida nas amplificações prévias realizadas no mesmo laboratório e/ou até mesmo por matéria orgânica advinda do próprio

pessoal do laboratório como cabelo, saliva e queratócitos, atuando como contaminadores (BOYD *et al.*, 1996).

As reações falso-negativas podem ocorrer devido às falhas na detecção do ácido nucléico, erros na mistura da reação, falha dos reagentes, temperaturas erradas utilizadas durante os diferentes ciclos, e ainda a qualidade inadequada do DNA, quando oriundo de tecidos embebidos com parafina (LO & FELDMAN, 1994).

Os *primers* MY09/MY11 (MY-PCR) e GP5+/GP6+ (GP+-PCR) são os mais usados no sistema de amplificação na detecção do HPV DNA em amostras clínicas. O MY-PCR é sintetizado com vários nucleotídeos em cada *primer* e é uma mistura de 25 outros *primers* capaz de amplificar uma variedade de tipos de HPV. O *primer* GP5+-PCR consiste em uma fixa seqüência de nucleotídeos para cada *primer* e detecta vários tipos de HPV, usando uma temperatura de anelamento diminuída durante a PCR (ZEHBE & WILANDER, 1996). Ambos têm como alvo o gene L1 e simultaneamente amplificam vários tipos de HPV genitais, sendo que o GP+-PCR pode detectar 19 diferentes genótipos, incluindo o 43 e o 44 que são menos eficientemente detectados pelo MY-PCR, sendo que este último é o mais freqüentemente utilizado em ensaios clínicos (COUTLEE *et al.*, 1997).

A escassez de estudos para detecção do HPV, utilizando o método da PCR com dois *primers* e em dois géis diferentes, despertou o interesse em avaliar o melhor método para o diagnóstico e prevalência do HPV no colo uterino.

## II. OBJETIVOS

Avaliar a sensibilidade dos géis de leitura de Agarose e de Poliacrilamida no diagnóstico do HPV pela Reação em Cadeia da Polimerase em escovado de colo uterino humano.

Avaliar a prevalência do HPV em escovado de colo uterino humano, usando a associação dos primers MY-PCR e GP+-PCR na PCR com géis de leitura de agarose e poliacrilamida.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram estudadas 86 amostras de material de colo uterino recebidas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia no período de março a abril de 2000. As amostras foram coletadas, usando escovas endocervicais por ginecologistas do ambulatório periférico da mesma Universidade e de consultórios particulares. Como consequência, as pacientes analisadas apresentavam condições sociais distintas. A média de idade das pacientes foi de 32 anos e 6 meses com desvio padrão de 11 anos e 8 meses, com uma amplitude de 18 a 66 anos.

O material coletado das regiões endocervicais e ectocervicais foi colocado em tubos estéreis, contendo 1ml do tampão de lise nuclear - TLN (Tris-HCl 10mM, EDTA 2mM e NaCl 400mM); em seguida, identificado com o nome da paciente, numerado e posteriormente encaminhado ao Laboratório para realizar a pesquisa.

Cada amostra recebeu uma numeração para facilitar o desenvolvimento da pesquisa. Estas foram colocadas em câmara fria na temperatura de 4°C até a realização da extração do DNA.

Este estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia e aprovada a sua realização em 05/04/1999 (anexo 1).

### 3.2. EXTRAÇÃO DO DNA DO MATERIAL ENDOCERVICAL

As amostras foram retiradas dos tubos já numerados e colocadas em *eppendorfs* (1,5ml), igualmente numerados, para realização da extração do DNA: em cada *eppendorf* foi colocado 1ml da amostra do material cervical em tampão de TLN, 20 $\mu$ L de proteinase K e 10 $\mu$ L de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), para auxiliar na degradação das proteínas que, em altas quantidades, influenciam na qualidade do DNA a ser extraído.

Estes *eppendorfs* foram incubados em banho-maria a 60°C por oito a 10 horas. Em seguida, foi acrescentado NaCl saturado no volume de 1/3 do volume da amostra, deixando por 10 minutos a -20°C. Posteriormente, foram centrifugadas a 15.000 rpm durante 15 minutos para precipitar os debris celulares. O líquido sobrenadante foi pipetado para um novo *eppendorf* devidamente numerado, sendo, em seguida, acrescentado duas vezes o volume da amostra de etanol absoluto e centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos para precipitar o DNA. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70% e posteriormente ressuspensos em 50 $\mu$ L de água deionizada e estocados a -20°C para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

### 3.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A metodologia empregada foi a descrita por **INNIS *et al.*** (1990). A amplificação pela PCR (aparelho de PCR da *MJ Research*) foi realizada com a utilização de quatro pares de *primers* degenerados que anelam na seqüência L1 do genoma do HPV: o MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') onde M= A+C, R= A+G, W= A+T e Y= C+T que amplificam cerca de 450 pares de bases (**MANOS *et al.***, 1989), e o GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') que amplificam 150 pares de bases (**QU *et al.***, 1997).

Cada reação de PCR foi realizada com 5 $\mu$ L de DNA genômico, 7,5 pmoles de cada *primer*, 10mM de cada dNTP, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 2,5 $\mu$ L de tampão da Taq-DNA polimerase e uma unidade da enzima Taq-DNA polimerase, em um volume final de reação de 25 $\mu$ L.

O programa utilizado na PCR (35 ciclos) está demonstrado na Tabela 2.

**TABELA 2. Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase.**

Programa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação	94	40 seg
Anelamento dos <i>primers</i>	58	40 seg
Extensão	72	40 seg
Extensão final	72	5 min

Para maior confiabilidade quanto ao resultado da PCR, todas as reações foram repetidas por duas vezes e só depois confirmado o diagnóstico. Impedindo que a concentração de DNA pudesse interferir na reação de amplificação, todas as amostras foram cuidadosamente manipuladas em condições semelhantes e a qualidade e concentração foram verificadas pela absorbância ( $A_{260}$ ) em espectrofotômetro e pela análise em gel de agarose.

#### **3.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E VISUALIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO**

As amplificações foram corridas em Gel de Agarose 1,5% (1,5g de Agarose em 100ml de tampão TBE) e tampão de gel de eletroforese de TBE 0,5X (Tris-HCl, EDTA e Ácido Bórico) (**SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIST, 1989**).

O gel foi submetido a uma voltagem constante [100 volts]. Após 1:30h de corrida, o gel foi levado à luz ultra-violeta para observação das bandas e posteriormente ao sistema de vídeo-documentação Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech) para realização das fotografias.

### 3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E VISUALIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO

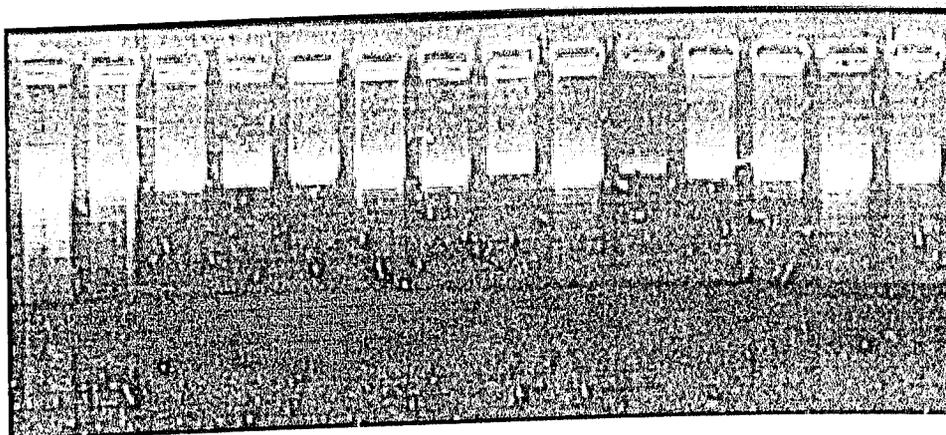
Após a realização da amplificação, 2 $\mu$ l de um corante de carregamento (0,125% *bromophenol blue*, 0,125% *xylene cyanole* e 12,5% ficoll 400 ou 50% glicerol) foram adicionados a 10 $\mu$ l do produto amplificado e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, realizada conforme **SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIST (1989)**. A concentração dos géis de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida – 30:0,8) foi de 10%. A eletroforese realizada em tampão 1x TBE (90mM Tris-Borato – 2mM EDTA pH 8,5) durante 2:30h. Após a eletroforese, a detecção dos fragmentos foi feita em coloração pela prata, conforme descrito por **BUDOWLE *et al.* (1991)** com algumas modificações. Inicialmente, o gel foi fixado em solução de etanol 10% por 10 minutos, oxidado em ácido nítrico 1% por seis minutos, lavado em água destilada duas vezes, imerso em solução de 0,012M de nitrato de prata e 0,056% de formalina por 20 minutos, revelado com solução gelada (8°C) de 0,28M de carbonato de sódio anidro, 0,056% de formalina e 4 $\mu$ M de tiosulfato de sódio até a obtenção adequada da imagem. A reação foi parada em 10% de ácido acético glacial gelado e então o gel foi seco entre folhas de celofane. Os géis foram fotografados no sistema de vídeo-documentação Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech).

### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a análise estatística da PCR, foi aplicada a prova de McNemar (SIEGEL, 1975), adequada a amostras emparelhadas, cujos dados se apresentam em escala nominal (positivo x negativo). O nível de significância foi estabelecido em  $p= 0,05$  em uma prova bilateral e indicando com asterisco (\*) os valores significativos. O teste z (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1994) foi aplicado para a comprovação deste resultado. Em seguida foi realizado o teste de Kappa (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1994) que mede o acordo existente entre duas proporção, ou seja, a proporção das frequências esperadas e a das frequências observadas.

## **IV. RESULTADOS**

O presente estudo avaliou 86 amostras de material cervical para a detecção do papilomavírus humano (HPV), usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta foi realizada, utilizando-se dois *primers* e dois géis distintos. Cada amostra foi submetida a quatro reações. Visando aferir o poder de confiabilidade das reações, observou-se a qualidade das amostras visualizadas no gel que indicou que o procedimento padrão da extração de DNA foi eficiente (Figura 7).

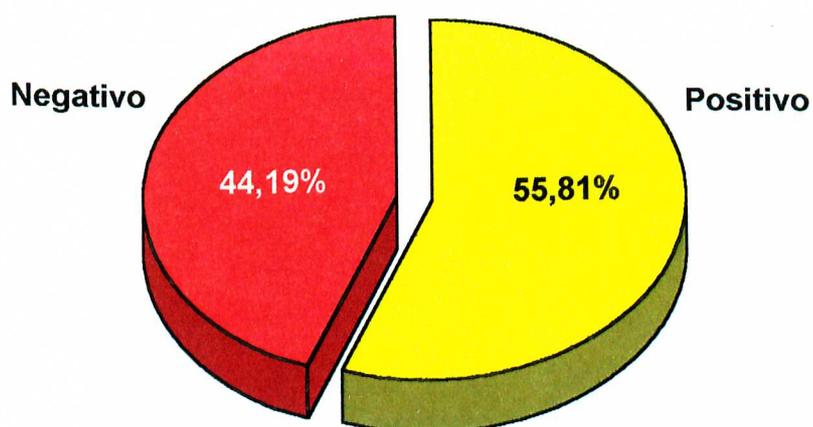


**FIGURA 7. Padrão eletroforético do DNA genômico extraído das amostras cervicais.**

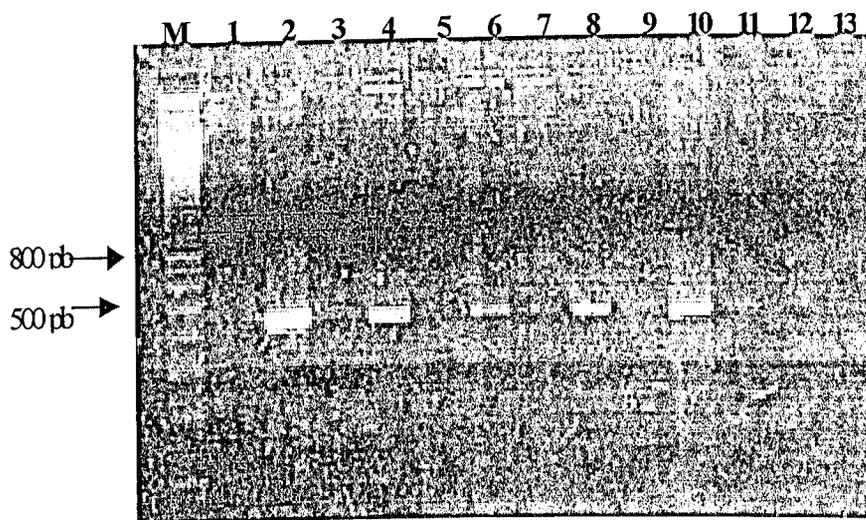
Das 86 amostras de colo uterino submetidas a estudo pelo PCR, encontrou-se uma positividade em 48 delas, com uma prevalência de 55,81% para a população analisada (Tabela 3 e Figura 8).

**TABELA 3. Diagnóstico da infecção por HPV pela PCR.**

<b>Resultado</b>	<b>Número de amostras</b>
Positivo	48
Negativo	38
<b>Total</b>	<b>86</b>

**FIGURA 8. Prevalência da infecção do HPV diagnosticado pela PCR.**

O primer MY09/MY11 detectou 14 amostras (16,27%) positivas em gel de agarose (Figura 9) e 20(23,25%) em gel de poliacrilamida, sendo que este último detectou todas as amostras positivas no gel de agarose e mais seis em poliacrilamida (Tabela 4 e 5 e Figura 10). O teste de McNemar, com as freqüências de reações positivas e negativas usando este primer e os dois géis tem o valor de  $X^2 = 4,17$  com  $0,025 < p < 0,05$  e indica que houve diferença significativa entre os resultados de positividade, sendo os valores mais elevados com o gel de poliacrilamida. O valor do teste de  $z=2,044$  com  $p=0,04$  reforça o dado anterior. O valor do teste de Kappa de  $K=0,78$  indica que existiu 78% de acordo entre as duas reações.



**FIGURA 9.** Amplificação pela PCR das amostras de material cervical pelos marcadores MY09/MY11, indicando ausência e presença do HPV. M (marcador); Colunas 1, 3, 5, 7, 9 e 12 (ausência); Colunas 2, 4, 6, 8, 10 e 11 (presença); Coluna 13 (controle com ausência de DNA).

**TABELA 4. Resultado individual por amostra para o *primer* MYO9/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida.**

Amostra	MYO9/MY11	
	Agarose	Poliacrilamida
2	Negativo	Positivo
4	Negativo	Positivo
7	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo
20	Positivo	Positivo
22	Positivo	Positivo
27	Positivo	Positivo
31	Positivo	Positivo
33	Positivo	Positivo
41	Negativo	Positivo
46	Negativo	Positivo
59	Negativo	Positivo
68	Negativo	Positivo
69	Positivo	Positivo
70	Positivo	Positivo
73	Positivo	Positivo
75	Positivo	Positivo
76	Positivo	Positivo
77	Positivo	Positivo
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>20</b>

TABELA 5. Positividade total para o *primer* MYO9/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida.

MYO9/MY11	AGAROSE	POLIACRILAMIDA
	N	N
Positivos	14	20*
Negativos	72	66
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>86</b>

\*  $p = 0,05$ .

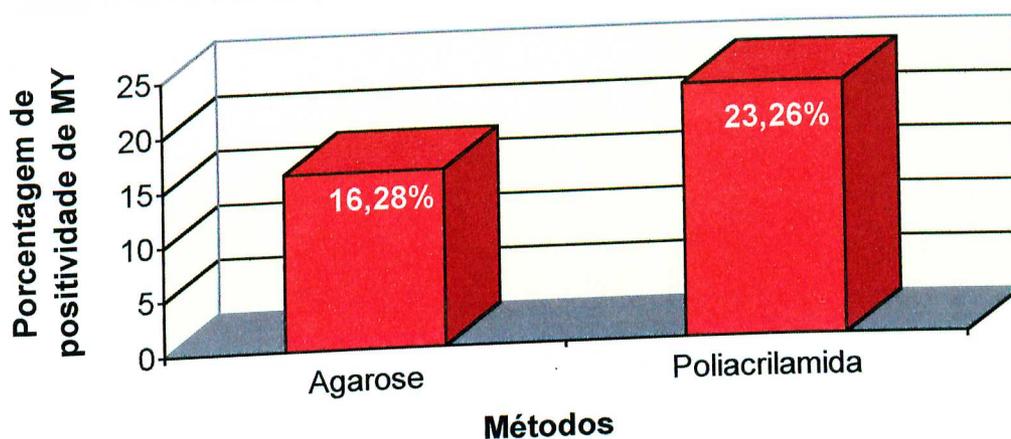
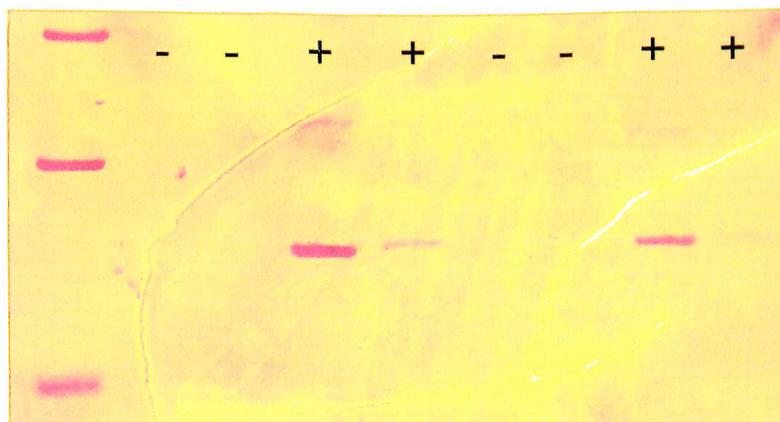


FIGURA 10. Prevalência do *primer* MYO9/MY11 em géis de Agarose e Poliacrilamida.



**FIGURA 11.** Gel de Agarose corado com brometo de etídio de produto amplificado pelos marcadores GP5+/GP6+, apresentando fragmento de 150pb. As amostras estão identificadas como positivas (+) ou negativas (-). A primeira coluna está representada pelo padrão de peso molecular conhecido (100pb Ladder).



**FIGURA 12.** Gel de Poliacrilamida corado por prata de produto amplificado pelos marcadores GP5+/GP6+, apresentando fragmento de 150pb. As amostras estão identificadas como positivas (+) ou negativas (-). A primeira coluna está representada pelo padrão de peso molecular conhecido (100pb Ladder).

TABELA 6. Resultado individual por amostra para o *primer* GP5+/GP6+ em géis de Agarose e Poliacrilamida.

Amostra	GP5+/GP6+	
	Agarose	Poliacrilamida
1	Positivo	Positivo
2	Negativo	Positivo
3	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo
10	Negativo	Positivo
11	Negativo	Positivo
13	Negativo	Positivo
16	Negativo	Positivo
17	Negativo	Positivo
18	Negativo	Positivo
24	Negativo	Positivo
26	Positivo	Positivo
27	Positivo	Positivo
31	Negativo	Positivo
34	Positivo	Positivo
35	Positivo	Positivo
36	Positivo	Positivo
38	Negativo	Positivo
39	Positivo	Positivo
41	Negativo	Positivo
42	Positivo	Positivo
44	Positivo	Positivo
46	Negativo	Positivo
47	Positivo	Positivo
51	Negativo	Positivo
52	Negativo	Positivo
53	Negativo	Positivo
54	Negativo	Positivo
68	Negativo	Positivo
73	Negativo	Positivo
74	Positivo	Positivo
76	Negativo	Positivo
77	Positivo	Positivo
79	Negativo	Positivo
80	Negativo	Positivo
81	Negativo	Positivo
82	Negativo	Positivo
84	Positivo	Positivo
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>38</b>

TABELA 7. Resultado total para o *primer* GP5+/GP6+ em géis de Agarose e Poliacrilamida.

GP5+/GP6+	AGAROSE	POLIACRILAMIDA
	n	N
Positivos	15	38*
Negativos	71	48
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>86</b>

\*  $p = 0,05$ .

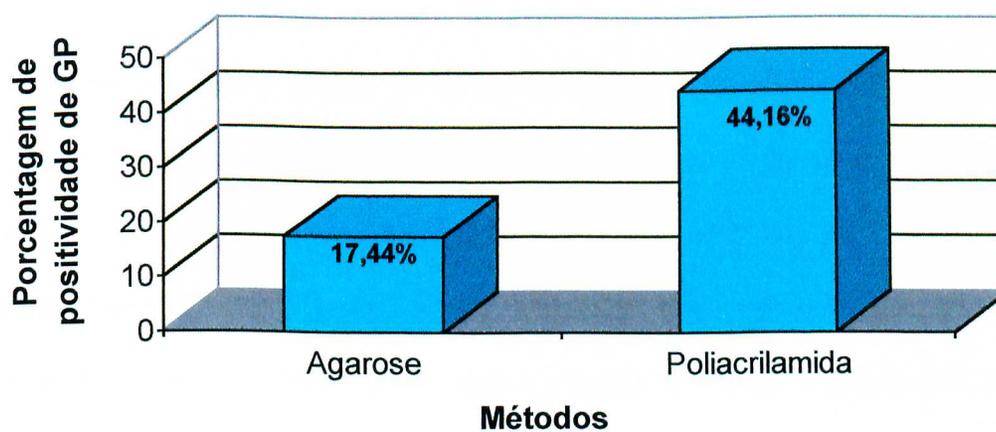


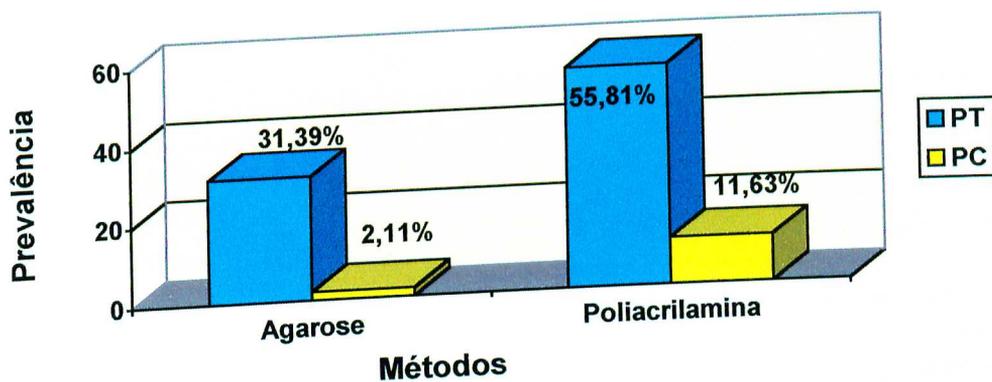
FIGURA 13. Prevalência para o *primer* GP5+/GP6+, em géis de Agarose e Poliacrilamida.

No gel de poliacrilamida, 10 amostras apresentaram-se comuns para ambos os marcadores (11,63%), sendo que a prevalência neste gel é equivalente à prevalência total de 55,81%. O teste de McNemar com as freqüências de reações positivas e negativas obtidas com este gel e os primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+ tem-se que o valor  $X^2 = 7,60$  com  $0,005 < p < 0,01$  e indica que existe diferença significativa entre os resultados de positividade, sendo que o maior valor foi com o primer GP+-PCR. O valor do teste  $z = 2,76$  com  $p = 0,008$  confirma este achado, sendo que o Kappa de  $K = 0,06$  indica que o acordo entre as duas reações foi de 6%.

Considerando os resultados com a agarose associada aos dois primers, a positividade foi de 27 (31,4%), sendo que duas (2,33%) foram positivas nos dois pares de primers testados. O teste McNemar com as freqüências de reações positivas e negativas obtidas com este gel e os primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+ tem-se que o  $X^2 = 0$  com  $p > 0,05$  e indica que não existe diferença significativa entre os resultados. O valor do teste  $z = 0$  com  $p = 1$  confirma este resultado, sendo que o Kappa  $K = -0,037$  mostra que o acordo entre as reações é menor do que se poderia observar em uma única chance (Tabela 8 e Figura 14).

**TABELA 8.** Diagnóstico em géis de Agarose e Poliacrilamida no resultado positivo total (PT) ou positivo comum (PC) aos dois *primers*.

Géis	Prevalência	
	PT	PC
Agarose	27	2
Poliacrilamida	48	10



**FIGURA 14.** Prevalência em géis de Agarose e Poliacrilamida no resultado positivo total (PT) ou positivo comum (PC) aos dois *primers*.

## V. DISCUSSÃO

A detecção do Papilomavírus Humano (HPV) no aparelho genital feminino está se tornando fundamental na definição de condutas das lesões do colo uterino e no prognóstico para o acompanhamento de pacientes com maior risco para desenvolvimento de câncer cervical. Em humanos, o HPV está relacionado com grande variedade de lesões benignas como verrugas, cistos epiteliais, neoplasias intra-epiteliais anogenitais, oro-laríngeas e faríngeas, papilomas e outras hiperqueratoses, e tem correlação direta com lesões malignas visto que o DNA viral é encontrado na maioria dos cânceres de colo uterino (**SPANDIDOS et al., 2000**).

Estudos conduzidos nos últimos 20 anos têm mostrado que o câncer cervical é uma doença de causa multifatorial e de longa latência (**FRANCO, 2000**). O HPV é atualmente o principal fator relacionado com esta patologia. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é o método mais sensível para identificar a infecção do HPV em amostras clínicas de colo uterino (**QU et al., 1997**). Contudo, fatores adversos podem interferir nesta reação, sendo necessária uma investigação rigorosa, evitando a ocorrência de resultados falso-negativos e falso-positivos. Fatores como qualidade e concentração do DNA na amostra, concentração de  $MgCl_2$ , temperatura de anelamento, diferentes tipos virais, carga viral no colo uterino, diferentes sistemas de detecção e sensibilidade dos géis de leitura podem afetar, juntos ou isolados, o resultado final do diagnóstico molecular pela PCR e como consequência, a determinação da prevalência real da infecção do HPV.

Aproximadamente 100% dos cânceres de colo uterino contêm HPV em suas células (**CRUM, 2000; STOLER, 2000**). Este fato isolado mostra a

importância na determinação da presença do vírus no colo uterino, principalmente em mulheres positivas com vírus de alto risco, mesmo que assintomáticas ou naquelas que têm algum achado sugestivo da presença do vírus em exames clínicos ou em exames de triagem rotineiramente utilizados. O prognóstico do câncer invasivo de colo uterino é dependente do potencial oncogênico do tipo de HPV associado (**LOMBARD *et al.*, 1998**).

Em sua ação, o HPV integrar-se ao DNA das células cervicais que estão em divisão, provocando a formação de células tumorais através da deleição provocada por uma região específica do vírus (E2 e L2), além da ação de dois genes do seu genoma (E6 e E7) que são ativos na replicação e transformação celular (**ZUR HAUSEN, 1999**).

Os exames de biologia molecular, especialmente a PCR, poderão serem utilizados no rastreamento e detecção de pacientes com infecção pelo HPV, além de servir de parâmetro para o esclarecimento de pacientes portadoras do vírus à importância de cuidar-se com relação a outros fatores implicados na gênese do câncer de colo, principalmente o tabagismo e a promiscuidade sexual. Os resultados destes testes influem de forma decisiva no tratamento das lesões pré-neoplásicas do colo uterino (**SCHOELL, JANICEK & MIRHASHEMI, 1999**).

O exame citológico é importante na triagem de lesões do colo uterino. Utilizando a citologia nos últimos 40 anos, houve decréscimo de aproximadamente 70% na mortalidade por câncer de colo, porém sua incidência ainda é a segunda maior causa de câncer entre as mulheres de

países desenvolvidos e a primeira nos países em desenvolvimento (SEDLACEK, 1999).

Na prática clínica, a validade do método molecular no diagnóstico e na detecção do papilomavírus é questionada por alguns autores. Estudos mostram que os exames de biologia molecular não melhorariam os resultados obtidos com a associação da colposcopia e citologia na triagem das lesões cervicais (GOODMAN, 2000). Porém, como a avaliação citológica varia de acordo com a interpretação e experiência do citologista, sofrendo influência de vários outros fatores como adequação da coleta, fixação do material, preparação da lâmina, controle de qualidade das leituras realizadas, a ocorrência de altos índices de falso-negativos mostra a deficiência deste método diagnóstico (STOLER, 2000). A sensibilidade da citologia é baixa, embora a especificidade do esfregaço cervical seja alta para lesões de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de alto grau e câncer, e baixa para lesões de baixo grau (SPITZER, 1998).

Evidências de acompanhamento por citologia têm apontado que a infecção por HPV sofre um drástico decréscimo de sua prevalência com o aumento da idade das mulheres, sendo que a maioria das infecções resolvem-se espontaneamente e aquelas que persistem são mais comumente causadas por tipos virais de alto risco e com maiores evidências de progredirem para lesões cervicais de alto grau (REMMINK *et al.*, 1995; SELDACEK, 1999). Este fator é importante, principalmente se estiver associado vírus de alto risco com alta carga viral. A presença da infecção do HPV tem um risco atribuído de 85% a 90% para o desenvolvimento de displasia cervical (STOLER, 2000).

A presença do vírus isoladamente parece não ser suficiente para o desenvolvimento de lesões cancerosas cervicais sem a presença de outros cofatores. Assim, o tabaco, a promiscuidade sexual, os efeitos hormonais esteroidais, a luz ultra-violeta e principalmente a imunodeficiência têm forte implicação na patogênese da doença pelo HPV no colo uterino (**GOODMAN, 2000**). Dessa forma, as pacientes com teste de biologia molecular positivo para HPV deveriam serem avaliadas mais regularmente, com menor intervalo de tempo, enquanto que as pacientes com teste negativo poderiam ter um intervalo de avaliação mais longo de cinco a 10 anos (**STOLER, 2000**).

É impossível definir exatamente a real incidência e/ou prevalência da infecção por HPV, principalmente pelo caráter efêmero da infecção e a ausência de lesões visíveis à macroscopia, já que as verrugas genitais representam apenas o topo visível do "iceberg" nas mulheres e homens infectados, isto é, menos de 1% da incidência total (**SEDLACEK, 1999; McGLENNEN, 2000**). Em sua história natural, sabe-se que a maioria das infecções por HPV regride espontaneamente em um período de 12 a 24 meses. A detecção de baixos níveis de HPV não tem valor clínico porque altos níveis de infecção são necessários; porém, não suficientes para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical e câncer. Mulheres que permanecem infectadas com carga viral baixa têm risco baixo de desenvolver doenças significativas (**SPITZER, 1998**), enquanto que maior número de cópias do genoma viral é visto com maior frequência em pacientes com lesões mais severas (**CHANG et al., 1997**). A detecção do HPV no colo uterino de mulheres

com neoplasias intra-epiteliais cervicais tem tornado primordial nos seus seguimentos (HO *et al.*, 1995).

A prevalência de HPV nesta amostragem foi de 55,81%. Este dado foi determinado pela positividade observada em gel de poliacrilamida, associando os dois pares de *primers*. Das 48 amostras positivas, 25 casos foram determinados após a utilização do gel de poliacrilamida. Porém, considerando apenas o *primer* GP5+/GP6+, notar-se-á que este foi responsável pelo diagnóstico de 21 novos casos, o que equivaleria a 84% de novos diagnósticos. Isto demonstra que a reação da PCR, usando esta associação de gel de poliacrilamida e o *primer* GP5+/GP6+ foi superior às demais ( $p < 0,001$ ) e que poderia ser a melhor opção diagnóstica, ou seja, menor incidência de falso-negativos em casos de optar somente por uma reação.

Estes dados refletem a prevalência real final da população estudada, independente de ser assintomática ou sintomática para infecção de HPV, uma vez que as amostras foram recebidas e numeradas sem histórico de sintomas e/ou sinais prévios indicativos da infecção pelo vírus que pudessem interferir ou dirigir o exame. Assim, também não foram colhidas as informações sobre a citologia, o histórico clínico ou colposcópico da paciente para a realização do exame diagnóstico por PCR.

A prevalência usando o *primer* MY09/MY11 foi de 16,27% em gel de agarose e 23,25% em gel de poliacrilamida. Este *primer* é mais usado em estudos na América do Norte e Sul e na Ásia (QU *et al.*, 1997). Existe diferença estatística significativa entre as duas reações ( $p = 0,04$ ) com a poliacrilamida,

umentando em 42% a prevalência da amostra. Mesmo para o *primer* MY09/MY11 que amplifica 450 pares de base, o gel de poliacrilamida melhora a visualização dos resultados. O uso da poliacrilamida fez o diagnóstico de todas as reações positivas em gel de agarose e mais algumas possíveis falso-negativos neste gel. O acordo de 78% de positividade em ambos os géis de leitura indica que as duas reações têm substancial concordância, porém com melhor sensibilidade de leitura no gel de poliacrilamida.

Com os dados obtidos com o *primer* GP5+/GP6+, fica mais evidente a importância do gel de poliacrilamida na leitura dos resultados. Este *primer* é mais comumente utilizado nos estudos europeus (QU *et al.*, 1997). A prevalência com gel de agarose foi de 17,44%, enquanto que com o de poliacrilamida foi de 44,18%. Isto representou um aumento no diagnóstico relevante ( $p < 0,001$ ) do gel de poliacrilamida para o de agarose. Todas as reações positivas em gel de agarose foram visualizadas no de poliacrilamida; porém, com um acordo entre elas de moderada concordância (42%) devido ao grande aumento na positividade, usando a leitura em poliacrilamida. Como o *primer* GP5+/GP6+ amplifica 150 pares de base, o resultado final da reação é melhor visualizado no gel de poliacrilamida cuja evidência das bandas neste sistema de eletroforese é muito mais sensível que o de agarose (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIST, 1989).

A infecção do HPV no aparelho genital inferior é a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis (SEDLACEK, 1999). Após infectar as células cervicais, o seu genoma é mantido como episoma no núcleo celular. Nas lesões de neoplasia intra-epitelial cervical e câncer, ele é integrado ao

cromossoma das células hospedeiras (VILLA, 1997). A prevalência da infecção pelo HPV em nossa amostra foi 55,81%, sendo superior ao encontrado por outros autores, uma vez que neste estudo estão envolvidas as reações com o uso de dois *primers* e dois géis para a detecção do vírus.

Comparando isoladamente as reações, observar-se-á que a prevalência neste trabalho é compatível com outros estudos realizados. O *primer* MY09/MY11 em gel de agarose (16,27%) e em poliacrilamida (23,25%) e o *primer* GP5+/GP6+ com gel de agarose (17,44%) são compatíveis com os dos trabalhos publicados na literatura, mostrando uma prevalência que varia de 15% a 25%. A maioria destes estudos foram realizados usando-se somente um *primer*, sendo o gel de agarose o mais utilizado na eletroforese de leitura da PCR. O aumento da prevalência foi relevante com a associação de poliacrilamida e o *primer* GP5+/GP6+ (44,18%); porém, mesmo assim estaria proporcional aos 43% encontrados em outro estudo realizado com mulheres jovens (HO *et al.*, 1998), e próximo à positividade da casuística de São Paulo que foi de 38% de positividade (FRANCO *et al.*, 1999). É importante caracterizar que a casuística do presente estudo foi realizada sem a seleção prévia de pacientes quanto à presença ou ausência de sintomatologia para infecção do HPV, bem como não tendo a interferência do fator da idade da paciente ou triagem de lesões prévias.

Este estudo mostrou de forma bem definida a diferença na prevalência do HPV usando as quatro reações, tanto observando o tipo do *primer* utilizado, como analisando a leitura dos géis em eletroforese. O par de *primer* GP5+/GP6+ foi mais eficiente da detecção do HPV, principalmente

utilizando o gel de poliacrilamida na leitura das reações. Isto é contrário aos resultados da literatura que não observou diferença significativa entre os marcadores GP5+/GP6+ e MY09/MY11 no diagnóstico do HPV, somente na determinação de infecções múltiplas em que o *primer* GP+-PCR falhou em aproximadamente metade das amostras, porém, mais de um tipo de HPV foi detectado pelo *primer* MY-PCR (QU *et al.*, 1997). Outro estudo que analisou os dois *primers* em uma reação de PCR-*nested* em biópsia de colo de útero, também não apresentou diferença significativa na sensibilidade dos dois marcadores na determinação da infecção pelo HPV (ZEHBE & WILANDER, 1996). Ambos os estudos foram realizados com os dois *primers* em gel de agarose, tornando-se compatível com os dados desta amostra que neste mesmo gel de leitura não se observou diferença significativa comparando os dois *primers* ( $p > 0,05$ ); todavia, também não se encontrou nenhum acordo quando se comparou as duas reações.

O uso de vários *primers* associados aumenta a chance de diagnóstico das pacientes falso-negativas atribuída ao uso de um *primer* isoladamente como demonstrado em biópsia de pacientes com carcinoma invasor de colo de útero (KARLSEN *et al.*, 1996; QU *et al.*, 1997). Na amostra estudada, quando se usou a associação dos *primers*, somente ocorreram dois casos comumente detectado no gel de agarose (2,33%). Com o uso associado dos dois *primers* aumentou a prevalência diagnosticada de HPV pelo gel de agarose em 31,39%, sendo melhor que os resultados obtido com um *primer* isoladamente. Isto é próximo dos achados da literatura em que a associação dos *primers* MY011/MY09 e GP5/GP6 adicionou de 15% a 25% de positividade

encontrada do HPV em colo uterino com NIC (FEOLI-FONSECA *et al.*, 1998). No gel de poliacrilamida, 10 amostras foram comumente diagnosticadas pelos dois *primers* (11,63%), com nenhuma concordância entre as reações. Com os dois *primers* juntos, a prevalência foi de 55,81% neste gel, refletindo uma maior efetividade na determinação da presença do HPV no colo uterino que o gel de agarose, bem como maior sensibilidade no diagnóstico que comparado com o uso isolado de um primer.

Os *primers* amplificam fragmentos de DNA de várias regiões do genoma do HPV. Têm-se desenvolvido e utilizado diferentes combinações destes *primers* no diagnóstico da infecção pelo papilomavírus humano. Porém, os *primers* que amplificam fragmentos de DNA na região conservadora de L1 têm-se tornado os mais utilizados nos estudos epidemiológicos e na prática clínica (QU *et al.*, 1997). Fatores ligados aos *primers* podem interferir na positividade da PCR e como consequência na prevalência de infecção da população analisada. A alta sensibilidade da PCR com *primer* tipo-específico explicaria porque algumas amostras dão resultados positivos nesta reação e negativos em PCR com *primer* de consenso.

O *primer* MY-PCR tem dificuldade em amplificar longos produtos de amostras contendo baixa quantidade de DNA. O *primer* GP+-PCR amplifica curtos produtos em PCR com maior sensibilidade em amostras de câncer de colo uterino e poderia ser mais usado na detecção de HPV neste caso. A associação oportuna destes aumenta a positividade da reação, diminuindo os falso-negativos que poderiam estar correlacionados com uma deleição ou mutação na região de L1 em que ocorre o anelamento no início da PCR

(KARLSEN *et al.*, 1996). Os *primers* de consenso como MY e GP+ têm espectro de detecção viral diferente, sendo mais seletivos para determinados tipos de HPV. A associação dos dois em uma reação de PCR-*nested* com 20 ciclos para o MY e 30 ciclos para o GP+ aumenta a sensibilidade em 10 a 100 vezes, comparando-se ao MY isoladamente (ZEHBE & WILANDER, 1996). Isto indica que a associação dos *primers* deverá tornar-se uma opção para o diagnóstico do HPV em colo uterino, aumentando a sensibilidade da PCR como encontrado neste estudo.

As pacientes negativas com o MY e positivas com o GP+ são provavelmente devido a amostras com baixa carga viral onde o MY não faz o diagnóstico por amplificar produtos longos com 450pb, porém o GP+ que amplifica produtos curtos com 150pb faz a detecção. As amostras de pacientes negativas em GP+ e positivas em MY refletem provavelmente o potencial diferente de habilidade destes *primers* em amplificar tipos virais mais sensíveis a cada um deles. Porém, como neste estudo não se fez a tipagem do HPV, esta hipótese fica correlacionada com relatos de trabalhos prévios da literatura (QU *et al.*, 1997).

Mudanças realizadas nos *primers* melhoram a sensibilidade da PCR. Na modificação do *primer* GP5/GP6 para GP5+/GP6+, ocorreu um acréscimo de 20% na sua sensibilidade, aumentando concomitantemente a sua especificidade. Em relação à temperatura da reação, a PCR *hot-start* aumentou a sensibilidade em 7% quando comparada à *cold-start* (ZEHBE & WILANDER, 1996). O estudo que modificou o *primer* MY09/11 para PGMY09/11 aumentou a prevalência de 62,8% positivos contra 55,1% positivos com MY09/11. Esta

reação utilizou a PCR com *primers* biotinizados e os produtos foram revelados por reação colorimétrica que é superior ao gel de agarose e semelhante ao de poliacrilamida, tendo múltiplas infecções detectadas com maior sensibilidade pelo *primer* PGMY09/11 (40% contra 33,8% dos positivos) (GRAVITT *et al.*, 2000).

Estudos têm mostrado que técnicas de detecção do HPV podem subestimar a sua verdadeira prevalência em amostras de material cervical. Isto estaria relacionado com o uso de somente um tipo específico de *primer* ou com géis de leitura da reação como deste trabalho. A variação da concentração viral, indicada pela intensidade diferencial das bandas observadas nos géis, sugere que muitos fatores podem influenciar a amplificação: tipo viral, qualidade dos reagentes, condições de amplificação, concentração de Taq DNA polimerase, DNA molde e  $MgCl_2$ , além da qualidade do DNA e do tipo de eletroforese (INNIS *et al.*, 1990). Procurou-se padronizar todas as condições, inclusive a concentração do DNA molde; permitindo, assim, apenas a variação da concentração de vírus em cada amostra. A indicação de que certos tipos virais têm maior ou menor replicação no hospedeiro associada à baixa resolução do gel de agarose e infecções precoces, explica naturalmente a grande variabilidade na detecção do HPV, conseqüentemente influenciando na obtenção de resultados falso-negativos e na prevalência das amostras.

Todos os aspectos da variabilidade do HPV evidenciam que este vírus está evoluindo com o hospedeiro e que se pode encontrar um de baixo risco associado a uma lesão de maior grau, demonstrando que o desenvolvimento do câncer depende da resistência imunológica da mulher

(ODUNSI *et al.*, 1996). Um teste de diagnóstico de HPV associado à citologia ou isolado, usado em sistemas de triagem primária, poderia melhorar a sensibilidade dos programas de prevenção do câncer de colo uterino. Assim, selecionam-se pacientes com maior necessidade de repetir o exame citológico e colposcópico em menores intervalos de tempo, de acordo com a presença ou ausência de tipos virais de alto risco. A utilização da PCR pode colaborar no estudo da história natural evolutiva da infecção pelo HPV que se mistura com a história evolutiva do câncer de colo uterino (COUTLEE *et al.*, 1997).

Como vários outros vírus, o HPV é um fascinante organismo. Após o contato e a infecção, é extremamente difícil ou impossível a sua erradicação do organismo. É um vírus associado a várias doenças; porém, com alto índice de regressão espontânea mesmo na ausência de tratamento. Naturalmente, um grande número de questionamentos a seu respeito ainda permanece sem resposta. Assim, a importância do estudo da infecção pelo HPV vem aumentando em consequência da sua alta prevalência e de estudos epidemiológicos que confirmam a sua relação com câncer cervical, bem como causa direta das neoplasias intra-epiteliais cervicais, independente de outros fatores de risco. Com os avanços da biologia molecular, a padronização de testes precisos e altamente sensíveis para detecção do HPV estreitou ainda mais a relação HPV e carcinoma cervical. As técnicas de biologia molecular têm-se mostrado eficientes, visto que a sensibilidade desses exames possibilita a descoberta do vírus, sua tipagem e carga viral mesmo na ausência de doença instalada, contribuindo de forma decisiva com a determinação de prognóstico da paciente contaminada.

Dessa forma, uma otimização adequada da reação de PCR com aumento de sua sensibilidade tem-se tornado imprescindível para a melhoria diagnóstica, diminuindo tanto as reações falso-positivas quanto as falso-negativas que poderiam interferir no estudo da prevalência real da infecção do HPV na população.

**VI. CONCLUSÕES**

O gel de poliacrilamida foi superior ao de agarose no diagnóstico do HPV, tanto para o *primer* GP+-PCR quanto para o MY-PCR.

A associação dos *primers* GP+-PCR e MY-PCR aumentou a positividade do diagnóstico do HPV pela PCR nos dois géis de leitura utilizados.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Segundo NBR-6023 de agosto de 2000 da ABNT.

- ABRÃO, F. S.; VILLA, L. L.; CARVALHO, F. M. *et al.* Critérios e conduta terapêutica das infecções pelo papilomavírus no trato genital inferior. **Femina**, v. 6-9, p. 381-388, 1994.
- ANDROPHY, E. J. Human papillomavirus: current concepts. **Arch. Dermat.**, v. 125, p. 683-685, 1989.
- ARENDS, M. J.; BUCKLEY, C. H.; WELLS, M. Etiology, pathogenesis of cervical neoplasia. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 96-103, 1998.
- ASTORI, G.; LAVERGNE, D.; BENTON, C. *et al.* Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, p. 752-755, 1998.
- BENSON, P. M. What's new in sexually transmitted diseases. **Advances in Dermatology**, v. 11, p. 85-103, 1996.
- BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; De SANJOSE, S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. **Biomed. Pharmacother.**, v. 51, p. 268, 1997.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 796, 1995.
- BOYD, A. S.; ANNARELLA, M.; RAPINI, R. P. *et al.* False-positive polymerase reaction results for human papillomavirus in lichen planus: potential laboratory pitfalls of this procedure. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 35, p. 42-46, 1996.
- BREAM, G. L.; OHMSTEDE, C-A.; PHELPS, W. C. Characterization of human papillomavirus types 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. **J. Virol.**, v. 67, p. 2655-2663, 1993.
- BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A. M. *et al.* Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high resolution PAGE. **Am. J. Human Genet.**, v. 48, p. 137-144, 1991.
- CARR, J.; GYORFI, T. Human papillomavirus: epidemiology, transmission, and pathogenesis. **Clin. Lab. Med.**, v. 20, n. 2, p. 235-255, June. 2000.
- CHANG, D. Y.; CHEN, R. J.; LEE, S. C.; HUANG, S. C. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, n. 1, p. 54-60, 1997.
- CHEAP, P. L.; LOOI, L. M. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. **Malays J. Pathol.**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 1998.

CHELLAPPAN, S.; KRAUS, V. B.; KROGER, B. *et al.* Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 4549, 1992.

CHEN, S.; O'SULLIVAN, H.; TABRIZI, S. N. *et al.* Prevalence and genotyping of HPV in cervical cancer among Australian woman. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v. 67, n. 3, p. 163, 1999.

COUTLEE, F.; MAYRAND, M. H.; PROVENCHER, D.; FRANCO, E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. **Clin. Diagn. Virol.**, v. 8, n. 2, p. 123-141, 1997.

CRUM, C. P. Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell. **Mod. Pathl.**, v. 13, n. 3, p. 243-251, 2000.

DANOS, O.; GIRL, J.; THIERRY, F.; YANIV, M. *Papillomavirus* genomes: sequences and consequences. **J. Invest. Dermatol.**, v. 83, p. 7-11, 1984.

DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R. G. Basic & clinical: biostatistics. 2. Ed. Connecticut: Appleton & Lange. 1994.344 p.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **N. Engl. Med.**, v. 322, p. 178-183, 1990.

FELDMAN, S. R.; LYE, K. D.; SMITH, E. S. *et al.* Polymerase chain reaction and its application for the diagnosis and management of skin diseases. **Adv. Dermatol.**, v. 12, p. 115-136, 1997.

FEOLI-FONSECA, J. C.; OLIGNY, L. L.; FILION, M. *et al.* A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detecting and typing human papillomaviruses in pathological specimens. **Diagn. Mol. Pathol.**, v. 7, n. 6, p. 317-323, 1998.

FRANCO, E. L. Statistical issues in human papillomavirus testing and screening. **Clin. Lab. Med.**, v. 20, n. 2, p. 345-367, 2000.

FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P. *et al.* Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **J. Inf. Diseases**, v. 180, p. 1415-1423, 1999.

FUCHS, P. G.; IFTNER, T.; WENINGER, J.; PFISTER, H. Epidermodysplasia verruciformis - associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. **J. Virol.**, v. 58, p. 626-634, 1986.

GENG, Y.; EATON, E. N.; PICÓN, M. *et al.* Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. **Oncogene**, v. 12, p. 1173-1180, 1996.

GOODMAN, A. Role of routine human papillomavirus subtyping in cervical screening. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v. 12, n. 1, p. 11-14, 2000.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GUIMARÃES, E. M.; BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S. D. J. Human papillomavirus detection em cervical dysplasias or neoplasias and in *condylomata acuminata* by *in situ* hybridization Whit Biotinylated DNA Probes. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 34, n. 4, p. 309-314, 1992.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J. Virol.**, v. 65, p. 473, 1991.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cell. **J. Virol.**, v. 66, p. 2125, 1992.

HANKINS, C.; COUTLEE, F.; LAPOINTE, N. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group. **CMAJ**, v. 160, p. 185, 1999.

HO, G. Y.; BURK, R. D.; KLEIN, S. *et al.* Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia [see comments]. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 18, p. 1365-1371, 1995.

HO, G. Y. F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L. *et al.* Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 423-428, 1998.

HUDSON, J. B.; BEDELL, M. A.; MCCANCE, D. J. *et al.* Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. **J. Virol.**, v. 64, p. 519, 1990.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SININSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols: a guide to methods and applications.** New York: Academic Press, 1990.

JIN, X. W.; CASH, J.; KENNEDY, A. W. Human papillomavirus typing and the reduction of cervical cancer risk. **Cleve. Clin. J. Med.**, v. 66, n. 9, p. 533-540, 1999.

JOHNSON, D. G.; SCHWARZ, J. K.; CRESS, W. D. *et al.* Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. **Nature**, v. 365, p. 349-352, 1993.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; JENKINS, A. *et al.* Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2095-3000, 1996.

KAUFMAN, R. H.; ADAM, E. Is human papillomavirus testing of value in clinical practice? [see comments]. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 180, n. 5, p. 1049-1053, 1999.

KLINGELHURTZ, A. J.; FOSTER, A. S.; McDOUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, p. 79-82, 1996.

KOUTSKY, L. A. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am. J. Med.**, v. 102, p. 3, 1997.

LAZO, P. A. The molecular genetics of cervical carcinoma. **Br. J. Cancer**, v. 80, n. 12, p. 2000-2018, 1999.

LECHNER, M. S.; MACH, D. H.; FINICLE, A. B. *et al.* Human papillomavirus E6 protein bind p53 *in vivo* and abrogate p53-mediated repression of transcription. **EMBO. J.**, v. 11, p. 3045, 1992.

LIAW, K. L.; GLASS, A. G.; MANOS, M. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytological normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, p. 954, 1999.

LO, A. C.; FELDMAN, S. R. Polymerase chain reaction: basic concepts and clinical applications in dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 30, p. 250-260, 1994.

LOMBARD, I.; VICENT-SALOMOM, A.; VALIDIRE, P. *et al.* Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 8, p. 2613-2619, 1998.

LORINCZ, A. T.; REID, R. **HPV**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997.

MAJEWSKI, S.; JABLONSKA, S. Human papillomavirus – associated tumores of the skin and mucosa. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 36, p. 659-685, 1997.

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K. *et al.* The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.

McGLENNEN, R. C. Human papillomavirus oncogenesis. **Clin. Lab. Med.**, v. 20, n. 2, p. 383-406, 2000.

McLACHLIN, C. M. Human papillomavirus in cervical neoplasia: role, risk factors, and implications. **Clin. Lab. Med.**, v. 20, n. 2, p. 257-270, 2000.

MELNICK, J. L.; ALLISON, A. C.; BUTEL, J. S. *et al.* Papovaviridae. **Intervirolology**, v. 3, p. 106-120, 1974.

MÜNGER, K.; PHELPS, W. C.; BUBB, V. *et al.* The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J. Virol.**, v. 63, p. 4417, 1989.

MURDOCH, J. B.; CASSIDY, L. J.; FLETCHER, K. *et al.* Histologic and cytologic evidence of viral infection and human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and normal tissue in the west of Scotland: evaluation of treatment policy. **Br. Med. J.**, v. 296, p. 381-385, 1988.

NORONHA, V.; MELLO, W.; VILLA, L. *et al.* Human papillomavirus associated with uterine cervix lesion. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 3, p. 235-240, 1999.

ODUNSI, K.; TERRY, G.; HO, L. *et al.* Susceptibility to human papillomavirus associated cervical intra-epithelial neoplasia is determined by specific HLA DR-DQ alleles. **Int. J. Cancer**, v. 67, n. 5, p. 595-602, 1996.

PAGANO, M.; DÜRST, M.; JOSWIG, S. *et al.* Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. **Oncogene**, v. 7, p. 1681, 1992.

PFISTER, H.; FUCHS, P. G. Papillomavirus: particles genome organization and proteins. In: SYRJANEN, K. J.; GISSMANN, L. G. (Eds.) **Papillomavirus and Human Disease** Berlin: Springer, 1987.

PONTEN, J.; GUO, Z. Precancer of the human cervix. **Cancer Surv.**, v. 32, p. 201-229, 1998.

- QU, W.; JIANG, G.; CRUZ, Y. *et al.* PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 1304-1310, 1997.
- REID, R.; CAMPION, M. J. Human papillomavirus associated lesions of the cervix: biology and colposcopic features. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 32, p. 157-179, 1989.
- REMMINK, A. J.; WALBOOMERES, J. M.; HELMERHORST, T. J. *et al.* The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. **Int. J. Cancer**, 4, v. 61, n. 3, p. 306-311, 1995.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. A.; STAFFEL, S. *et al.* Primer directed enzymatic amplification DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SALAS, L. M. A.; BAYGHEN, E. P. Regulation genetica de los papilomavirus humanos genitales. **Salud Publica de Mexico**, v. 3, p. 240-247, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIST, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANCHEZ PERES, A. M.; SORIANO, S.; CLARKE, A. R.; GASTON, K. Disruption of the papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2f-induced apoptosis. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 3009-3018, 1997.
- SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D. *et al.* The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, p. 495-505, 1993.
- SCHNEIDER, A.; MEINHARDT, G.; De VILLIERS, E. M.; GISSMANN, L. Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. **Diagn. Cytopathol.**, v. 3, p. 250-255, 1987.
- SEDLACEK, T. V. Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infection. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 42, n. 2, p. 206-220, 1999.
- SEDMAN, J.; STENLUND, A. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. **EMBO. J.**, v. 14, p. 6218-6228, 1995.

SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica, para ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1975. 350p.

SMOTKIN, D. Virology of human papillomavirus. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 32, p. 117-126, 1989.

SOUTHERN, A. S.; HERRINGTON, C. S. Molecular events in uterine cervical cancer. **Sex. Transm. Infect.**, v. 74, n. 2, p. 101-109, 1998.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 98, p. 503-517, 1975.

SPANDIDOS, D. A.; DOKIANAKIS, D. N.; KALLERGI, G.; AGGELAKIS, E. Molecular basis of gynecological cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 900, p. 56-64, 2000.

SPITZER, M. Cervical screening adjuncts: recent advances [see comments]. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 179, n. 2, p. 544-556, 1998.

STIRDIVANT, S. M.; HUBER, H. E.; PATRICK, D. R. *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 protein inhibits DNA binding by the retinoblastoma gene product. **Mol. Cell Biol.**, v. 12, p. 1905, 1992.

STOLER, M. H. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for Carcinogenesis. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 19, p. 16-28, 2000.

STRAIGHT, S. W.; HINKLE, P. M.; JEWERS, R. J. *et al.* The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. **J. Virol.**, v. 67, p. 4521-4532, 1993.

SURIS, J. C.; DEXEUS, S.; LOPES-MARIN, L. Epidemiology of preinvasive lesions. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 302-305, 1999.

SYRJÄNEN, K. J. Biology of human papillomavirus infection and their role in squamous cell carcinogenesis. **Med. Biol.**, v. 65, p. 21-39, 1987.

TACHEZY, R.; HANSIKOVA, E.; HJEK, T. *et al.* Human papillomavirus genotype spectrum in Czech woman: correlation of HPV DNA presence whit antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus- like particles. **J. Med. Virol.**, v. 58, n. 4, p. 378-386, 1999.

THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the interaction in the molecular pathogenesis of HPV. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7690-7700, 1999.

- TUREK, L. P.; SMITH, E. M. Programação genética dos papilomasvírus humanos genitais na infecção e no câncer. **Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte**, v. 4, p. 711-733, 1996.
- VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 71, p. 321-341, 1997.
- WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.
- WEINBERG, R. A. E2F and cell proliferation: A world turned upside down. **Cell**, v. 85, p. 457-459, 1996.
- WEINTRAUB, S. J.; CHOW, K. N. B.; LUO, R. X. *et al.* Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. **Nature**, v. 375, p. 812-815, 1995.
- WEINTRAUB, S. J.; PRATER, C. A.; DEAN, D. C. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. **Nature**, v. 358, p. 259-261, 1992.
- XIONG, Y.; KUPPUSWAMY, D.; LI, Y. *et al.* Alteration of cell cycle kinase complexes in human papillomavirus E6- and E7- expressing fibroblasts precedes neoplastic transformation. **J. Virol.**, v. 70, p. 1008, 1996.
- ZAZOVE, P.; REED, B. D.; GREGOIRE, L. *et al.* Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus – related cervical lesions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 9, p. 2708-2713, 1998.
- ZEHBE, I.; WILANDER, E. Two consensus primer systems and nested polymerase chain reaction for human papillomavirus detection in cervical biopsies: a study of sensitivity. **Hum. Pathol.**, v. 27, n. 8, p. 812-815, 1996.
- ZUR HAUSEN, H. Yohei Ito Memorial Lecture: papillomaviruses in human cancers. **Leukemia**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 1999.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infection: a major cause of human cancers. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

**ANEXO**



**Universidade Federal de Uberlândia**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
 Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
 CEP 38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

*PROJETO DE PESQUISA: "Quantificação e tipagem do papiloma vírus humano associado a diferentes níveis de neoplasias intra-epiteliais cervicais".*

DEPARTAMENTO Departamento de Genética e Bioquímica- UFU

PESQUISADOS RESPONSÁVEL: Luiz Ricardo Goulart Filho

**PARECER:** Amostras de rotina serão colhidas no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, em exames colposcópicos realizados e classificados nos diferentes graus de neoplasia

As pacientes deverão assinar o termo de consentimento informando do que consiste a metodologia empregada, equipe técnica, resultados, implicações e direitos do paciente. Assim sendo, somos de parecer favorável a realização do projeto de pesquisa em questão.

Uberlândia 05 de abril de 1999

*Humberto Eustáquio Goelho*  
 Prof. Humberto Eustáquio Goelho  
 Comitê de Ética em Pesquisa da UFU