

**QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE  
E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM  
AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES  
INFECTADAS POR HPV**

**JUSSARA DE SOUSA RIBEIRO BETTINI**

**Ribeirão Preto  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto**  
**Departamento de Patologia**

---

**QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE E7 POR PCR EM  
TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES  
INFECTADAS POR HPV**

JUSSARA DE SOUSA RIBEIRO BETTINI

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Doutora em Patologia Experimental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Garcia Soares

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bettini, Jussara de Sousa Ribeiro

QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES INFECTADAS POR HPV.

Ribeirão Preto - São Paulo, 2005.

103 pgs: Il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Programa de Pós-Graduação em Patologia. Área de Concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Soares, Edson Garcia

1. HPV, 2. PCR em tempo real, 3. Câncer de colo uterino, 4. SIL, 5. Gene E7

## **DEDICATÓRIA**

---

Aos amores da minha vida:

Meus filhos, Sarah e Arizinho e meu marido Daniel. Por todo amor, carinho,  
força, paciência e por estarem sempre comigo.

Aos meus pais, Ray e Benedito Ribeiro, pelo amor e suporte que me fez  
seguir em frente.

A minha irmã Aline de Sousa Ribeiro, por tudo e pelo eterno carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares, meu orientador, pela sua competência, oportunidade e orientação.

Ao Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, pela colaboração e orientação.

Aos componentes da banca julgadora Prof. Dr. Geraldo Duarte, Profa. Dra. Silvana Maria Quintana, Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain e Prfa. Dra. Ana Paula Morais Fernandes, pela atenção e auxílio.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, pela colaboração, paciência e amizade.

A Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, pela atenção e colaboração.

Aos Departamentos de Genética, Ginecologia e Obstetrícia e Clínica Médica pela oportunidade, amizade e colaboração.

À Capes (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) e FAEPA (Fundação de apoio ao ensino e a pesquisa) pelo suporte financeiro.

Ao comitê de Ética em pesquisa, pelo apoio e rapidez na aprovação deste trabalho.

Às amigas Maria do Carmo Tomitão Canas, Ana Lúcia Pimentel, Cláudia E. Wiesel e Sandra Rodrigues meu especial agradecimento pela imensurável colaboração e apoio.

A Renata Toscano Simões, pela colaboração, amizade e força.

A Isabela Jube Wastowski, pela ajuda na análise estatística.



A Ana Maria Rocha pela assistência na obtenção do material de trabalho.

A Alessandra Lopes Ruiz pelo paciência e auxílio na prática deste projeto.

Ao Dr. Ciro D. Martinhago, pelo auxílio e colaboração.

Aos meus colegas de trabalho pelo companheirismo, amizade e constante estímulo ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente à Neide Terezinha Gonçalves pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos (do peito), que sempre incentivaram, deram força e acompanharam de perto todas as etapas vividas nestes últimos anos.

Eternamente a meu marido, Daniel Ricardo Biazoli Bettini por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins, pela paciência, compreensão, carinho e dedicação, tornando possível a execução deste projeto.

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 CARCINOMA CERVICAL E PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 HPV.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. PATOGÊNESE E CITOISTOPATOLOGIA DO HPV.....	18
1.2.2 GENE E7.....	21
<b>1.3 PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>22</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
<b>4. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 EXTRAÇÃO DO DNA: .....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR): .....</b>	<b>38</b>
<b>5.4. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....</b>	<b>40</b>
5.4.1. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	40
5.4.2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA.....	41
<b>5.5. REGISTRO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.6PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>42</b>
<b>5.7CURVA PADRÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5.8ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>44</b>
<b>5.9ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>

---

<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
<b>10. RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<b>11. SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
<b>12.1 DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>81</b>
<b>12.2. TERMO DE CONSENTIMENTO.....</b>	<b>82</b>
<b>12.3. PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA.....</b>	<b>84</b>
<b>12.4. PROTOCOLO DE COLORAÇÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>12.5. CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>13. ARTIGO.....</b>	<b>91</b>

## **FIGURAS**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 CARCINOMA CERVICAL E PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 HPV.....</b>	<b>16</b>
1.2.1. PATOGÊNESE E CITOISTOPATOLOGIA DO HPV.....	18
1.2.2 GENE E7.....	21
<b>1.3 PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>22</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
<b>4. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 AMOSTRAS CLÍNICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 EXTRAÇÃO DO DNA: .....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR): .....</b>	<b>38</b>
<b>5.4. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO.....</b>	<b>40</b>
5.4.1. SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	40
5.4.2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA.....	41
<b>5.5. REGISTRO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5.6PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>42</b>
<b>5.7CURVA PADRÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>5.8ANÁLISE DOS RESULTADOS DA PCR EM TEMPO REAL.....</b>	<b>44</b>
<b>5.9ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>

	<b>10. RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<hr/>		
	<b>11. SUMMARY.....</b>	<b>76</b>
<hr/>		
	<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
<hr/>		
<b>12.1</b>	<b>DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>81</b>
<b>12.2</b>	<b>TERMO DE CONSENTIMENTO.....</b>	<b>82</b>
<b>12.3</b>	<b>PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA.....</b>	<b>84</b>
<b>12.4</b>	<b>PROTOCOLO DE COLORAÇÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>12.5</b>	<b>CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO.....</b>	<b>85</b>
<hr/>		
	<b>13. ARTIGO.....</b>	<b>91</b>

## TABELAS

<b>1.</b>	<b>RELAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA PCR _____</b>	<b>38</b>
<b>2.</b>	<b>PROGRAMAÇÃO PARA A EXECUÇÃO DA PCR _____</b>	<b>39</b>
<b>3.</b>	<b><i>PRIMERS</i> E SONDAS PARA A PCR EM TEMPO REAL _____</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>TITULAÇÕES DA CURVA PADRÃO _____</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>RELAÇÃO DAS 106 PACIENTES HPV POSITIVAS _____</b>	<b>88</b>

---

**1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Carcinoma cervical e Papilomavírus humano (HPV)

O carcinoma cervical é considerado como o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo. A incidência varia de 40/100.000 em muitos países subdesenvolvidos a 10/100.000 em países desenvolvidos (Boer *et al.* 2004). A infecção causada por certos tipos de HPV, é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer de colo de útero (Morberg *et al.* 2003).

Os primeiros relatos do envolvimento das infecções por HPV na carcinogênese foram publicados em 1974 (Hausen *et al.* 1974). A identificação de seqüências de DNA de tipos específicos de HPV 16 (Dürst *et al.* 1983) e HPV 18 (Boshart *et al.* 1984) em amostras de carcinoma cervical estimulou extensas investigações epidemiológicas de uma possível associação de tipos específicos de HPV com câncer cervical e lesões pré-cancerígenas (Gissmann *et al.* 1987).

Desde 1976 sabe-se que as lesões provocadas pelo HPV (condiloma plano, invertido e papilar) no trato genital feminino, são freqüentemente associadas a lesões epiteliais escamosas de baixo grau (*LSIL - Low Squamous Intraepithelial Lesions*), lesões epiteliais escamosas de alto grau (*HSIL - High Squamous Intraepithelial Lesions*) e câncer cervical invasivo (Syrjänen *et al.* 1983). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular mais de 55 tipos diferentes de HPV foram identificados em menos de 10 anos (McCance *et al.* 1986, Syrjänen *et al.* 1986).

Estudos recentes comprovaram que mais de 99% das amostras de biópsias com câncer cervical contêm seqüências de DNA de HPV, e o tipo mais comumente encontrado é o HPV16 (Morberg *et al.* 2003; Herrington *et al.* 1999; Walboomers *et al.* 1999). Além disso, genótipos de HPV foram identificados em 77% das amostras de biópsias de câncer cervical, cujos exames colposcópico e citohistopatológico (microscópio óptico) não sugeriram infecção por HPV e em um estudo feito com amostras que apresentavam um quadro de carcinoma cervical invasor, o DNA do HPV foi diagnosticado em 93% dos casos (Bettini *et al.* 2003; Herrington *et al.* 1999).

Há muitas infecções assintomáticas por HPV e somente pequena porcentagem de mulheres infectadas desenvolvem câncer cervical (Nguyen *et al.* 2005). O DNA do HPV foi detectado entre 10% e 50% de mulheres assintomáticas em idade reprodutiva e quando foi feita uma investigação prospectiva destas mulheres, colhendo seguidamente amostras cervicais seriadas, observou-se que a maioria das infecções é transitória e somente uma pequena proporção de mulheres tendem a permanecer com o mesmo tipo de HPV em amostras subseqüentes (Villa *et al.* 1997)

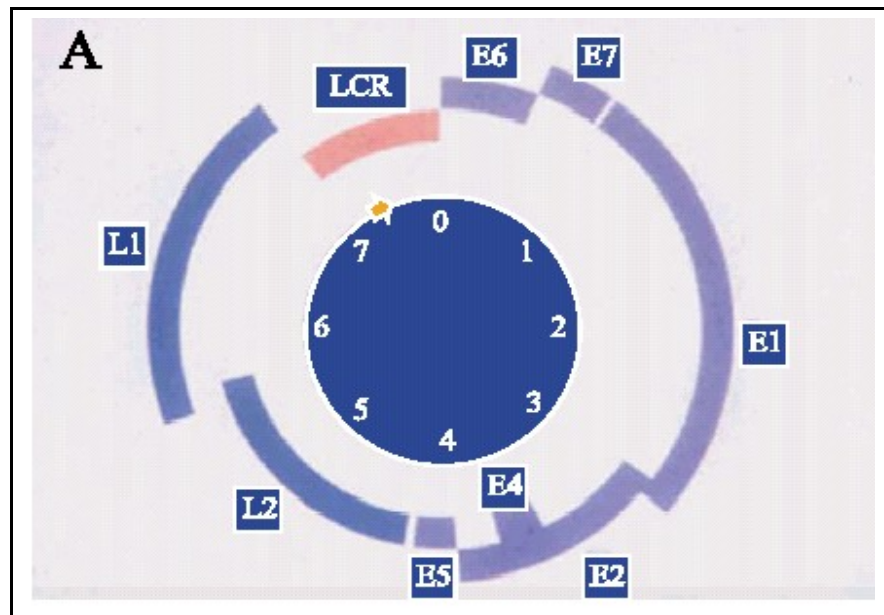
Há muitos anos sabe-se que o genoma de HPV persiste em tumores malignos, porém, pouco se sabe sobre os determinantes de risco da infecção persistente por esse vírus (Villa *et al.* 1997). Estudos epidemiológicos indicam que mulheres persistentemente infectadas por tipos oncogênicos de HPV são mais susceptíveis a desenvolver câncer cervical do que aquelas infectadas transitoriamente (Peitsaro *et al.* 2002; Schiffman 1995).



Em 1995 a Organização Mundial da Saúde concluiu que certos tipos de HPV são carcinogênicos. Vários estudos epidemiológicos e moleculares conduzidos nos últimos 20 anos têm confirmado que a infecção cervical por certos tipos de HPV é um evento precursor de câncer cervical (Bettini *et al.* 2003; Villa 1997; IARC Working Group 1995).

## **1.2 HPV**

O HPV pertence à família *Papovaviridae*. São vírus pequenos com diâmetro entre 40 a 55 nanômetros, compostos por um capsídeo icosaédrico, constituído por duas proteínas estruturais L1 e L2 (Villa 1997; Hausen e Villiers. 1994). O genoma de DNA de fita dupla circular do HPV tem cerca de 8000 pares de bases, peso molecular de  $5,2 \times 10^6$  daltons e é dividido nas regiões E (*early* - codifica as proteínas que serão produzidas inicialmente) e L (*late* - codifica as proteínas que serão produzidas após as proteínas da região E ). Essas duas regiões codificadoras representam respectivamente 45% e 40% do genoma viral e contêm as *open reading frames* (ORFs) E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 e L2 (figura 1). Entre as regiões E e L, está a região não codificadora denominada LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*), representando 15% do genoma viral, envolvida no controle da expressão de genes virais (O'Brien *et al.* 2002; Howley *et al.* 2001).



**Figura1.** Esquema dos genes (ORFs) do HPV (modificado de O'Brien *et al.* 2002)

Segundo Peitsaro *et al.* (2002), já foram descritos mais de 120 tipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 estão associados com lesões no trato anogenital. A especificidade tecidual dos HPVs parece ser exclusiva para o epitélio pavimentoso da pele e das mucosas e, de acordo com as propriedades biológicas, eles se dividem em dois grupos: cutâneotrófico e mucosatrófico. No grupo cutâneotrófico estão os HPVs agentes das verrugas plantares e os que causam as verrugas vulgares. Dentro deste grupo existe um subgrupo com cerca de 20 tipos de HPV que estão associados à epidermodisplasia verruciforme, uma doença epitelial rara. No grupo cutâneo há ainda HPVs de alto risco (HPV 5 e 8) que causam verrugas que podem progredir para câncer. No grupo mucosatrófico, os vírus são classificados

como de baixo, moderado e alto risco de progressão maligna. Os tipos 6 e 11 causam verrugas genitais benignas ou condilomas acuminados e estão associados a *LSIL* (displasia leve a moderada). Raramente associam-se com *HSIL* (displasia acentuada) ou câncer cervical invasivo. Os tipos 26, 42, 44, 53, 55, 62 e 66 apresentam padrões fisiopatológicos similares aos dos tipos 6 e 11. Ao contrário destes tipos, o HPV 16 e o HPV 18 são os que mais se associam a lesões intraepiteliais escamosas (*SIL - Squamous Intraepithelial Lesions*) e carcinoma invasor e os tipos de HPV relacionados ao 16 e 18 são 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 e 68 (Voglino *et al.* 2000; Ranst *et al.* 1993; Wilbur *et al.* 1988).

### **1.2.1. Patogênese e Citohistopatologia do HPV**

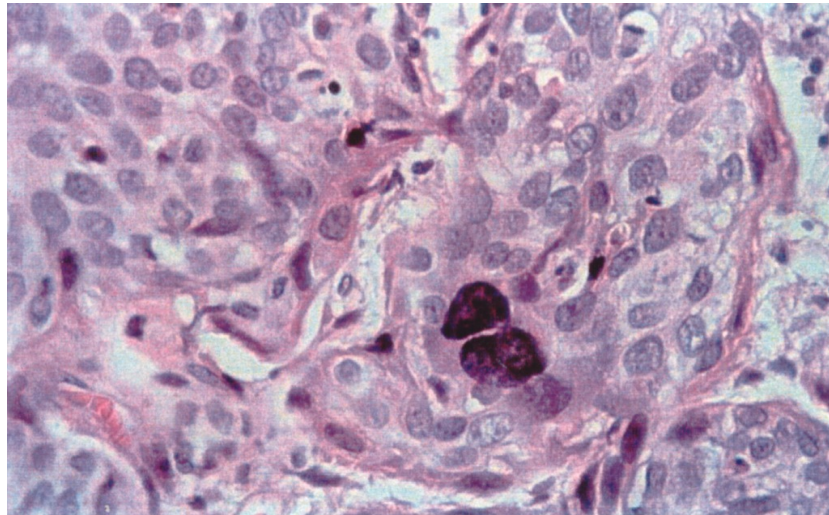
Papilomas são lesões epiteliais benignas que possuem um período de latência variando entre semanas, meses e anos. Os papilomas podem se desenvolver no epitélio escamoso estratificado envolvendo a pele ou mucosa. São chamados verrugas quando encontrados na pele e condiloma na genitália. As lesões podem permanecer por meses a anos e então regredir espontaneamente. Na infecção crônica, acredita-se que o vírus atinge células epiteliais basais que possuem longos períodos de capacidade proliferativa. A replicação do DNA viral, a expressão de altos níveis de proteínas virais e a montagem viral ocorrem na camada superior da epiderme, onde acontece a diferenciação celular terminal (Lehtinen *et al.* 2003; Lowy *et al.* 2001).

A infecção por HPV é caracterizada por uma epiderme espessada (acantose) com papilomatose e às vezes com hiperqueratose e parakeratose. As células da camada superior da epiderme podem ter núcleo anormal, excêntrico, picnótico e circundado por um halo claro (coilocitose). Os vasos capilares da derme se caracterizam por estar proeminentes e em processo de trombose (Lowy *et al.* 2001).

Todas as alterações provocadas pela infecção do HPV são causadas por uma combinação de funções dos genes virais. Os genes L1 e L2 codificam proteínas responsáveis pela integridade do capsídeo viral. E1 está diretamente envolvido na replicação do plasmídeo; é uma proteína necessária para a iniciação e síntese do DNA viral (Liu *et al.* 1995). E2 auxilia na replicação do DNA, aumentando a habilidade de E1 (Yang *et al.* 1991) e também faz a manutenção do genoma (Pirsoo *et al.* 1996). E4 induz colapso na rede de citoceratina; produzindo a imagem do halo de coilocitose, ajudando o vírus a penetrar na célula. Segundo alguns estudos, o E5 pode induzir algumas transformações celulares; entretanto, esta proteína não é expressada na maioria das *SIL* HPV positivas, sugerindo que este gene atue em papilomas benignos (Howley *et al.* 2001). E6 induz várias mudanças importantes na célula hospedeira, causando impacto no ciclo de vida normal da célula e no processo de imortalização. Porém, quando sozinho, não é capaz de imortalizar ceratócitos primários humanos (*HKF* – *Human Foreskin Keratocytes*), mas pode imortalizar eficientemente células epiteliais de mamíferos humanos (*HMEC* - *Human Mammary Epithelial*

*Cells*). Portanto, E6 juntamente com E7 imortalizam *HKF* (Mcmurray *et al.*, 2001).

O DNA viral está presente, da mesma forma, em células de tumores primários e em metástases, sendo transcricionalmente ativo. Em *LSIL*, os *ORFs* virais são expressados, principalmente, nos níveis superiores do epitélio (Stoler *et al.* 1992). Em *HSIL*, um número mais restrito de *ORFs* se expressam, principalmente E6 e E7, que são expressados na camada basal ou proliferativa do epitélio. Lesões mais evoluídas estão associadas à maior expressão desses genes. A displasia acentuada e a progressão para carcinoma, estão associadas com a integração do genoma viral, associadas à deleção de grandes segmentos do genoma viral e também à transcrição de seqüências da *LCR* (Nagao *et al.* 2002; Villa 1997; Baker *et al.* 1987).



**Figura 2.** Alterações em mucosa cérvico-vaginal. Células atípicas com hipercromasia nuclear, polimorfismo, cariomegalia, nucléolo proeminente, ceratinização, paraceratose e binucleação (hematoxilina e eosina, 200x).

### 1.2.2 Gene E7

O oncogene E7 do HPV é o responsável pela produção da oncoproteína E7. Esta proteína nuclear de mais ou menos 100 aminoácidos pode induzir a síntese de DNA em células inativas, a proliferação, imortalização e transformação celular, além de contribuir com a progressão carcinogênica. E7 altera os fenótipos de crescimento em uma variedade de tipos celulares, principalmente nos *HFK*. A imortalização dos *HFK* se correlaciona com a oncogenicidade de vários tipos de HPV, principalmente os subtipos 16, 18 e 31. Portanto este gene E7 é um fator importante na

progressão da replicação de células cancerígenas (Nagao *et al.* 2002; McMurray *et al.* 2001).

E7 interage com várias proteínas, se liga a proteína supressora de tumor do retinoblastoma (pRb), histona deacetilase (HDAC), fatores de transcrição AP-1 e inibidores cdk entre outras (Sathish *et al.* 2004). Com relação a pRb, reguladora do ciclo celular durante as fases S, G2 e M, E7 consegue desestabilizá-la e promover a sua proteólise. E7 desregula a pRB, causando a indução de E2F (fator de transcrição celular) que age na atividade de p19 interferindo na estabilidade da p53 (proteína supressora do crescimento tumoral) e causando a ativação do DNA celular para replicar genes necessários a multiplicação do DNA viral (Glahder *et al.* 2003; Howley *et al.* 2001). Além disso, esta oncoproteína provoca a duplicação anormal do centrosomo celular, causando perturbações mitóticas que resultam em aneuploidias, uma das características do câncer e principal contribuição do HPV para com a progressão maligna. (Sotlar *et al.* 2004; McMurray *et al.* 2001).

O papel do gene E7 e de todos os *ORFs* no ciclo de vida do HPV em uma infecção é a providência de um ambiente celular que favoreça a replicação e manutenção do DNA viral (Howley *et al.* 2001).

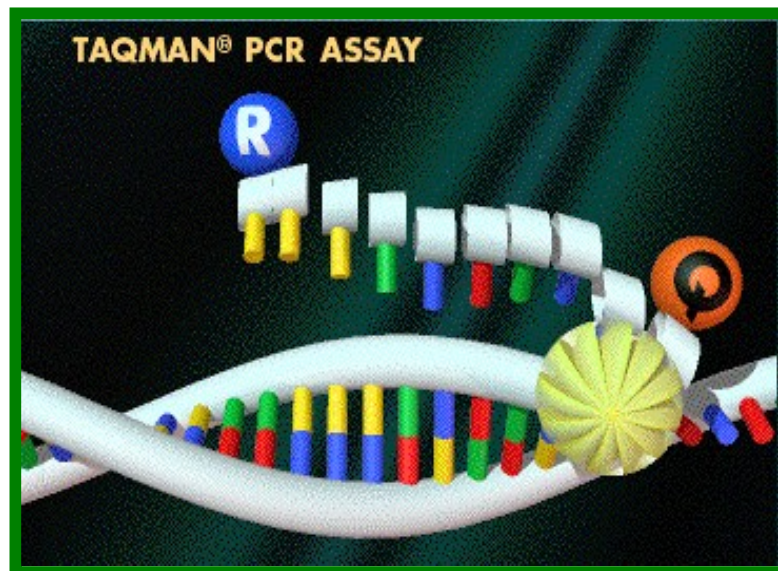
### **1.3 PCR em Tempo Real**

A *PCR* (*Polimerase Chain Reaction*) em tempo real é um método de detecção do *amplicom* que pode ser visualizado durante a progressão da

amplificação através do monitoramento do acúmulo de fluorescência, devido à utilização de vários fluorocromos, desenvolvidos recentemente e disponibilizados no mercado aliados a um equipamento eficiente para a detecção de fluorescências (Mackay *et al.* 2002). Essa técnica pode produzir dados no período de 2 - 3 horas e esse aumento na velocidade da reação na PCR em tempo real, é devido à remoção dos procedimentos de detecção pós-PCR (eletroforeses) e redução no tamanho do *amplicon* alvo (Mackay *et al.* 2002; Niesters 2001; Schmittgen 2001). A PCR em tempo real utiliza-se de sondas fluorogênicas que aumentam a especificidade da reação e seu equipamento composto por um sistema de tubos fechados evita contaminações e tem a capacidade de amplificar simultaneamente vários vírus em reações *multiplex*. As desvantagens dessa tecnologia em relação a PCR convencional incluem entre outras: a incapacidade de analisar o tamanho do *amplicon* e da sua seqüência de nucleotídeos e o custo elevado (Dorak 2002; Mackay *et al.* 2002).

Os fluorocromos mais comumente empregados nos dias de hoje são: *TaqMan*, *Syber Green* e *Molecular Beacons* (Ginzinger 2002; Mackay *et al.* 2002; Bustin 2000). O ensaio *TaqMan*, explora a atividade 5' - nucleásica da *AmpliTaqGold* DNA Polimerase para clivar uma sonda fluorescente (*TaqMan*), durante a PCR. A sonda *TaqMan* consiste de um oligonucleotídeo ligado em suas extremidades com um fluorocromo de detecção (5'- *reporter*) e outro de supressão (3'- *quencher*). O principal fluorocromo de detecção (*reporter*) utilizado é o *FAM* (6-carboxil-fluoresceína), embora outros sejam disponíveis (figura 3).





**Figura3.** Reagente químico da *PCR* em tempo real. *Taqman* (Modificado de *Applied Biosystems*).

Quando a sonda está na sua forma nativa, a proximidade entre os fluorocromos de detecção e supressão faz com que o fluorocromo de detecção transfira energia de excitação induzida pelo laser através de *FRET* (transferência de energia ressonante) para o supressor - *TAMRA* (6-carboxil-tetrametil-rodamina), que reduz o tempo de vida do estado excitado do fluorocromo de detecção capturando o excesso de energia e emitindo-a com sinal de fluorescência. Durante a *PCR*, os *primers* direto (*forward*) e reverso (*reverse*) hibridizam a seqüência específica do DNA alvo. Em seguida, a sonda *TaqMan* hibridiza a sua seqüência específica, localizada entre os

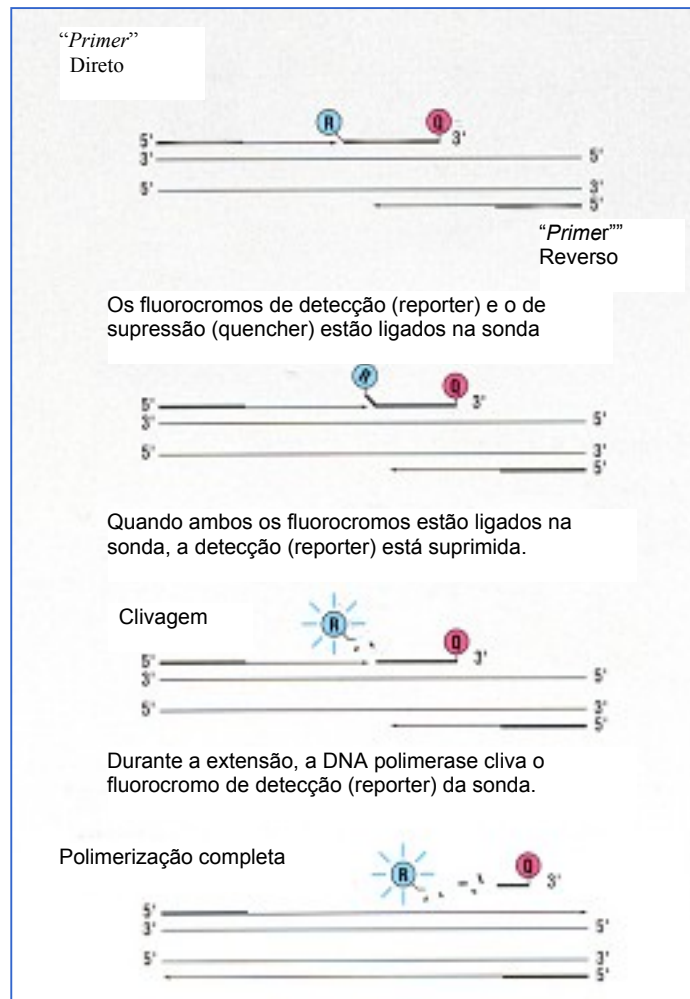
*primers* no DNA alvo. A *AmpliTaqGold* DNA Polimerase cliva a sonda *TaqMan* através da sua atividade nucleásica 5'-3". Assim os fluorocromos de detecção e supressão são separados após a clivagem, resultando em aumento da detecção de fluorescência conforme ilustrado na figura 4.

Esse processo ocorre em cada ciclo e não interfere com o acúmulo exponencial do produto. O aumento da fluorescência é medido, como consequência direta da amplificação da seqüência alvo durante a *PCR*. Ambos os *primers* e a sonda podem hibridizar o alvo para a amplificação; no entanto, o sinal fluorescente só será gerado se a seqüência alvo da sonda for amplificada durante a *PCR*. Assim, nenhuma amplificação não-específica é detectada.

No presente trabalho, foi utilizado o Sistema de Detecção de Seqüência (SDS) *GeneAmp 5700 (Applied Biosystems)*, capaz de excitar e detectar fluorescência e de realizar ciclos térmicos. Neste sistema, acoplados ao software, existem dois controles de calibração do aparelho (*ROX* e *ROI*). O *ROX* (6-carboxi-NNN'N'-tetra-metilrodamina) é a referência passiva, inclusa nos reagentes quantitativos, responsáveis pela normalização do sistema evitando flutuações de fluorescência, enquanto que o *ROI*, é a calibração interna do aparelho (Mackay *et al.* 2002; Manual do usuário *Applied Biosystems*).

O Sistema de Detecção de Seqüências *GeneAmp 5700 (Applied Biosystems)*, também emite dados térmicos da *PCR*, os quais são fornecidos através da curva de dissociação. Esta curva é usada para diferenciar a presença de produtos específicos dos inespecíficos na amostra,

principalmente os dímeros de *primers*, e além disso, ela também é capaz de classificar um produto amplificado como "puro", quando ele tem uma simples e consistente temperatura de *melting* ( $T_m$ ). Quando múltiplos produtos estão presentes, mais de uma ( $T_m$ ) é observada, e isto é devido principalmente à variação da quantidade de guanina/citosina (C-G), embora o comprimento do fragmento e sua composição também contribuam (Mackay *et al.* 2002; Bustin 2000).



**Figura 4** - Ensaio *TaqMan*. O ensaio utiliza uma sonda fluorogênica que consiste de um oligonucleotídeo flanqueado por um fluorocromo de detecção (*reporter*) e um de supressão (*quencher*). Durante a *PCR*, a sonda liga-se ao alvo de interesse entre o *primer* direto e reverso. Durante a extensão, a sonda é clivada pela atividade 5'- nucleásica da DNA polimerase. Isso separa os fluorocromos, gerando um aumento da intensidade da fluorescência (Modificado de *Applied Biosystems*).





O HPV contribui diretamente com o crescimento celular anormal característico de lesões displásicas e carcinomas. A quantidade de DNA viral presente no tumor pode representar um importante aspecto no curso da doença (Biedermann *et al.* 2004). A quantificação através da *PCR* em tempo real do gene E7 do HPV em mulheres infectadas pelo vírus avaliou a carga viral nestas amostras e as diferenças de quantidade de gene E7 entre os tipos de HPV. Desta forma procuramos dar mais um passo para o melhor entendimento da evolução das lesões provocadas pelo vírus.





Estudar a quantificação absoluta do gene E7, através da PCR em tempo real, em amostras cérvico-vaginais de mulheres infectadas por HPV tipos 16 e 18 sem ou com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo.

---

**4. ASPECTOS ÉTICOS**

A colheita de material cérvico-vaginal faz parte da rotina do exame preventivo procurado pelas pacientes com o objetivo de diagnóstico e/ou tratamento de alguma infecção; o único procedimento adicional a que as pacientes foram submetidas constituiu-se em uma única colheita de 3-5 ml de sangue por punção venosa.

Este projeto de pesquisa foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 139ª Reunião Ordinária realizada em 16/09/2002, e enquadrado na categoria APROVADO, de acordo com o Processo HCRP nº 1497/2002 (em anexo).

---

## **5. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **5.1 Amostras clínicas**

As amostras das mulheres que fazem parte deste projeto, foram obtidas em dois postos de saúde vinculados ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP): Centro Social e Comunitário de Vila Lobato (VL) e Centro de Saúde Escola (CSE) e de dois ambulatórios do próprio Hospital: Ambulatório de Moléstias Infecto - contagiosas em Ginecologia e Obstetrícia (AMIGO) e Ambulatório de Oncologia (AONC). Nos CSE e VL foram colhidas as amostras do grupo controle, visto que neles são feitos os atendimentos primários e de rotina. No AMIGO e AONC foi colhido o material de mulheres infectadas pelo HPV ou com suspeita da infecção e com lesões provocadas pelo vírus, pois estes ambulatórios são especializados em moléstias graves.

Nos postos de saúde VL e CSE e nos ambulatórios AMIGO e AONC, apresentamos o Termo de Consentimento Livre e esclarecido a todas as pacientes que se apresentaram para fazer o exame preventivo de Papanicolau (em anexo). Das pacientes que concordaram em participar, foi colhido duas amostras citológicas de raspado cérvico vaginal feitas com espátula de Ayre partida longitudinalmente. A espátula com o raspado foi colocada em um tubo tipo *ependorf* contendo tampão de lise de eritrócitos. As amostras devidamente identificadas foram estocadas a temperatura de – 20°C.

Foi colhido um total de 106 amostras de pacientes HPV positivas sem e com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo (tabela 5 em anexo), e 30 amostras de pacientes HPV negativas e sem lesões de colo uterino. De acordo com o tipo de HPV e com a presença ou não de lesões de colo uterino, as amostras foram escolhidas e separadas em três grupos: Grupo A (30 amostras de pacientes HPV positivas sem lesões de colo uterino). Grupo B (30 amostras de pacientes HPV positivas com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo). Grupo controle negativo (10 amostras de pacientes HPV negativas sem lesões de colo uterino).

## **5.2 Extração do DNA:**

A extração de DNA do material citológico foi realizada seguindo a metodologia descrita por Higuchi (1989), com pequenas modificações (em anexo). Centrifugamos o material citológico contido no *ependorf* com o tampão de lise de eritrócitos, a 6000 x g por 1 minuto para que as células precipitassem e retiramos cuidadosamente a espátula e a escovinha. Centrifugamos novamente o material e o sobrenadante foi descartado. No precipitado restante adicionamos 300µl de tampão de lise de leucócitos (Tris/HCl a 0,5M, KCl a 2M, MgCl<sub>2</sub> a 1M, NP-40 100% e Tween-20 100%) com 5µl de Proteinase K. Homogeneizamos a solução e incubamos a 65°C por uma hora e mais três horas a 37°C. Ao final desta incubação a amostra

foi aquecida a 94°C por 10 minutos para inativação da proteinase K e estocada a -20°C até o momento da análise.

### **5.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR):**

Para a *PCR* utilizamos 4µl de cada amostra de DNA, previamente extraído. Aliquotamos cada amostra em um microtubo tipo *ependorf* de 500 µl devidamente numerado, com auxílio de uma micropipeta e ponteiros estéreis. Para preparar a mistura de reação da PCR, utilizamos um *ependorf* de 1,5 ml. A mistura de reação foi composta, respectivamente, por: 12,25 µl de água deionizada autoclavada, 2,5 µl de tampão de reação (10x), 1,5 de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,25 µl de solução de dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato) (20mM), 4,0 µl de cada iniciador específico para o HPV 16 ou HPV 18 (2,5 pmol/µl), e 1,5 U de *Taq* polimerase (*Biotools* - Espanha) (1U/µl), fazendo um volume de 25µl. Em todas as análises foram utilizadas amostras do controle negativo e controle positivo para detecção de contaminação durante a reação e um marcador de 50pb.

Para o diagnóstico do HPV utilizamos os *primers* descritos por Ting *et al.* (1990) e para a tipagem do HPV utilizamos os descritos por Walboomers *et al.* (1999), os quais podem ser vistos na tabela 1. A este passo seguiu-se o programa específico para detecção do HPV.

**Tabela 1:** Relação dos *primers* utilizados.

<b>SISTEMA</b>	<b>SEQUÊNCIAS INICIADORAS</b>	<b>PB</b>
MY09	CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC*	450
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG*	450
HPV 16E7. 667	GATGAAATAGATGGTCCAGC**	100
HPV 16E7. 774	GCTTTGTACGCACAACCGAAGC**	100
HPV 18E7. 696	AAGAAAACGATGAAATAGATGGA**	100
HPV 18E7. 799	GGCTTCACACTTACAACACA**	100

\* Ting *et al.*, 1990\*\* Walboomers *et al.*, 1999

O programa para execução da *PCR* é composto por três etapas principais, que se repetem por vários ciclos. A etapa de desnaturação é responsável pela separação da dupla hélice do DNA, a uma temperatura de 94°C. Na etapa de pareamento ocorre a hibridação do iniciador (*primer*) com o DNA molde, a temperatura de 55 a 72°C. Por fim, a etapa de extensão é responsável pela síntese de um novo filamento de DNA. Os passos de cada um estão descritos na tabela 2.



**Tabela 2.** Programação para a execução da *PCR*

<b>ETAPA 1</b> (1Ciclo)	94°C por 5 minutos
<b>ETAPA 2</b> (35 Ciclos)	94°C por 1 minuto; 55°C por 40 segundos e 72°C por 45 segundos;
<b>ETAPA 3</b> (1 Ciclo):	72°C por 10 minutos, 4°C indefinidamente.

#### 5.4. Análise do produto amplificado

Para visibilização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em géis verticais de poliacrilamida não denaturantes, submetidos a condições eletroforéticas e corados de acordo com o método descrito por Sanguinetti *et al.* (1994) (em anexo).

##### 5.4.1. Separação eletroforética dos produtos amplificados

Em um microtubo foram misturados 4µl da amostra a ser analisada com 6µl de tampão (900µl de bromophenol, 900µl de xilenocyanol, 900µl de TBE (tris-ácido bórico-EDTA) 10X, 4,5ml de ficol 30%, 1,8ml de EDTA 0,5M pH8,0 e 3,6g de sacarose). Esta mistura foi aplicada em um gel de poliacrilamida não denaturante 10% sem pré-aquecimento das amostras.

O gel não denaturante foi feito diluindo-se a solução mãe de acrilamida (30%) para a concentração desejada (i.e., 8,00ml), TBE 10X para TBE 1X (i.e., 2ml), 1,4ml de glicerina bi-destilada e água destilada para o volume final de 20ml. À mistura de gel adicionou-se 500µl da solução

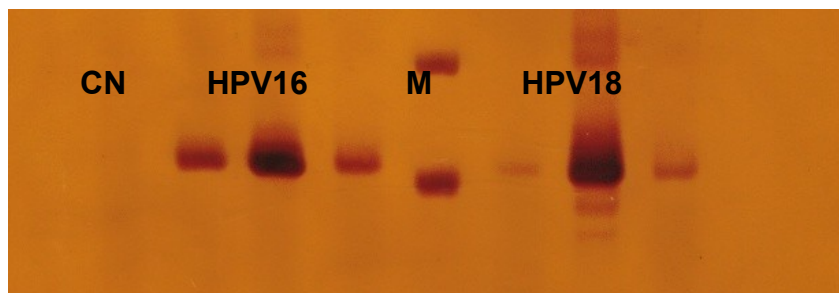
saturada de persulfato de potássio e 15 $\mu$ l de TEMED (tetrametiletilenodiamina) como catalizadores da reação de polimerização e imediatamente verteu-se a mesma em um cassete do tamanho determinado previamente montado. Este cassete era composto por duas placas de vidro e espaçadores presos com grampos de aço. Logo após verter-se o gel entre as placas, colocou-se o pente na borda superior e aguardou-se a polimerização por no mínimo 20 minutos.

O gel polimerizado foi montado em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE 1X em ambos pólos. Após a mistura com o corante, as amostras foram aplicadas no gel, assim como os devidos padrões de peso molecular. Após este procedimento, o equipamento foi ligado a uma fonte de alta voltagem e submetido a 200mA, constante, por um período de duas horas.

#### **5.4.2. Coloração com nitrato de prata**

Para revelação das bandas do material separado pela eletroforese, utilizou-se o método descrito por Sanguinetti *et al.* (1994) (em anexo). A primeira etapa foi de fixação, colocando o gel em 100ml de solução fixadora por cinco minutos no agitador (Hoefer Pharmacia Biotech Inc-Red Rocker - São Francisco CA, USA). A impregnação com nitrato de prata foi realizada em seguida, adicionando-se dois ml de nitrato de prata à solução fixadora, permanecendo o gel em agitação por mais cinco minutos.

Depois de descartada a solução fixadora com prata, o gel foi lavado em água corrente. Em seguida, colocou-se 100ml de solução reveladora com um ml de formaldeído sobre o gel, o qual foi agitado até o aparecimento das bandas. Logo após a coloração procedeu-se a leitura do gel (figura 5).



**Figura 5.** Gel mostrando a tipagem do HPV16 (108pb) e HPV18 (104pb). **M:** Marcador de 100pb e **CN:** Controle negativo

### **5.5. Registro dos Resultados**

Após a leitura dos géis, estes foram secos para serem arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro, à temperatura ambiente por dois ou três dias.

### **5.6 PCR em tempo real**

As amostras foram submetidas a *PCR* em tempo real para a quantificação absoluta do gene E7 nas pacientes infectadas pelo HPV 16 e

18. O DNA do gene E7 do HPV tipo 16 e tipo 18 foi quantificado por um sistema de detecção de seqüências de DNA *GeneAmp 5700* (*Applied Biosystems, Foster City, California*). O mix de *PCR* consiste de 3ul de DNA, 12,5ul de 2X universal master mix (*Applied Biosystems, Foster City, California*), 8,75ul de H<sub>2</sub>O estéril, 0,5ul do *primer forward* (10uM) e 0,5ul do *primer reverse* (10uM) e 0,5ul da sonda *TaqMan TAMRA* (5uM) fazendo um volume total de 25ul. As seqüências dos *primers* foram selecionadas utilizando o *Primer Express software* (versão 1.0) *Applied Biosystems*) (tabela 3).

**Tabela 3.** *Primers* e sondas específicos para a *PCR* em tempo real

HPV16E7-96F	AGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT
HPV16E7-182R	CACTTGCAACAAAACGTTACAATATTG
HPV16E7-122T	6FAMCAGCTGGACAAGCAGAACC GGACATAMRA
HPV18E7-2F	TGCATGGACCTAAGGCAACA
HPV18E7-78R	TAGAAGGTCAACCGGAATTTTCATT
HPV18E7-23T	6FAMTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCTAMRA

A amplificação foi feita com 50°C por 2 minutos e desnaturação inicial por 10 minutos a 95°C, seguida por 55 ciclos 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A curva padrão foi obtida por amplificação de uma série de diluições de dois clones do HPV16 e HPV18 em vetor pBR322 (doados por pela Dra. Ethel Michelle de Villiers , *German Câncer Center, Heidelberg, Germany*).

## 5.7 Curva Padrão

As curvas Padrão correspondentes aos tipos de HPV 16 e 18, indispensáveis para a quantificação absoluta do gene E7, foram construídas a partir de uma série de diluições, feitas em dois clones contendo o vetor PBR322 e o genoma completo do HPV16 e HPV18, utilizando o DNA ultra puro de *Escherichia Coli* (*Sigma*), como descrito no protocolo em anexo. Com as titulações foram obtidas 20.000, 6.000, 2.000, 600, 200, 60, 20, 6 e 2 cópias por microlitro de amostra para cada tipo de HPV (tabela 4). Assim sendo a curva padrão é composta dos seguintes padrões : 20.000; 6.000; 2.000; 600; 200; 60; 20; 6; 2 cópias/ $\mu$ l

**Tabela 4.** Referente às titulações realizadas para a construção da curva padrão

20.000 cópias/ $\mu$ l	180 $\mu$ l ( $10^5$ cópias) + 720 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
6.000 cópias/ $\mu$ l	60 $\mu$ l ( $10^5$ cópias) + 940 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
2.000 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (20.000 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
200 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (2.000 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
20 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (200 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
2 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (20 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
600 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (6.000 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
60 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (600 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)
6 cópias/ $\mu$ l	50 $\mu$ l (60 cópias/ $\mu$ l) + 450 $\mu$ l DNA de <i>E.coli</i> (2,5 ng/ $\mu$ l)

## 5.8 Análise dos resultados da PCR em tempo real

A análise é realizada visualizando-se a relação entre quantidade de DNA e Ct (ciclo do limiar - início da detecção de fluorescência), pois quanto maior o Ct, maior é a quantidade de DNA.

### **5.9 Análise estatística**

A análise estatística foi feita usando o teste de *Wilcoxon* no programa *Instat* versão 4.0 (*Graph Pad Software, USA*), baseado na quantidade de cópias do Gen E7 nas amostras, para verificar a diferença entre o grupo de pacientes HPV positivas com lesão, grupo positivo sem lesão e grupo negativo sem lesão, com significância designada de  $p < 0,05$ .

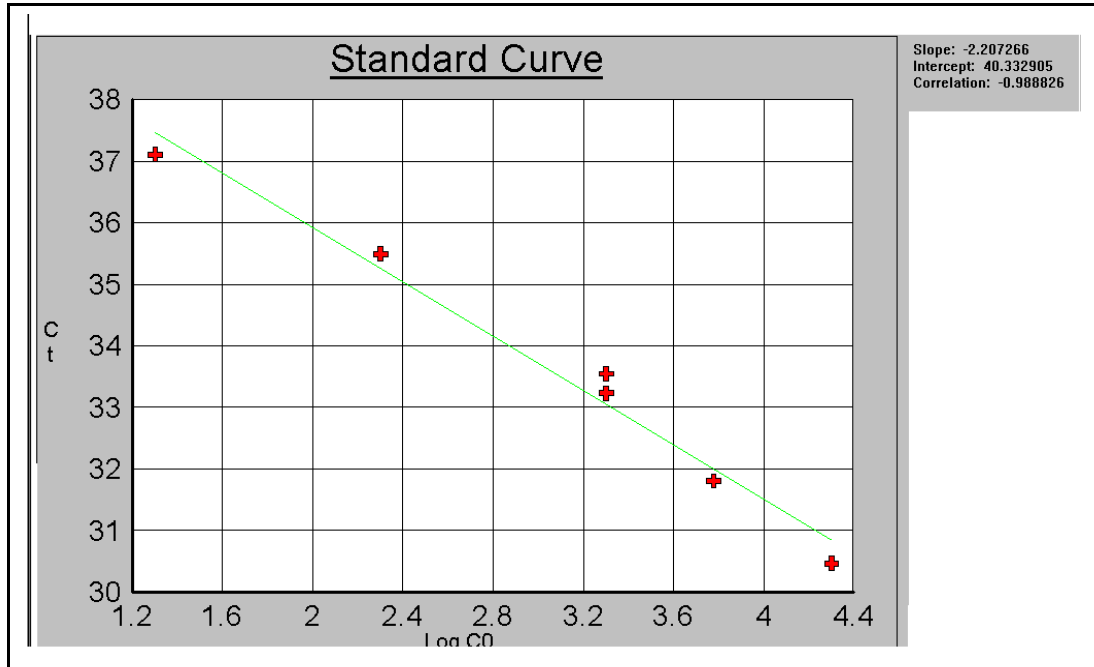
Este trabalho foi realizado com orientação dos professores: Dr. Edson Garcia Soares, Dr. Aguinaldo Luis Simões e Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca em laboratório totalmente equipado para a execução do projeto e com o apoio financeiro da CAPES, FAEPA e FAPESP.



As 70 amostras cérvico vaginais de mulheres infectadas pelo HPV16 e HPV18 sem lesões e com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, foram primeiramente submetidas a *PCR*, utilizando *primers* gerais, para o diagnóstico do vírus e *primers* específicos para a tipagem dos subtipos 16 e 18. Posteriormente, foi realizada a *PCR* em tempo real para quantificar o gene E7 usando *primers* e sondas específicos.

Os coeficientes de correlação para o HPV16 e 18 foram respectivamente  $r = 0,988826$  e  $r = 0,985172$ , indicando a boa qualidade dos padrões (figura 6 e figura 7).

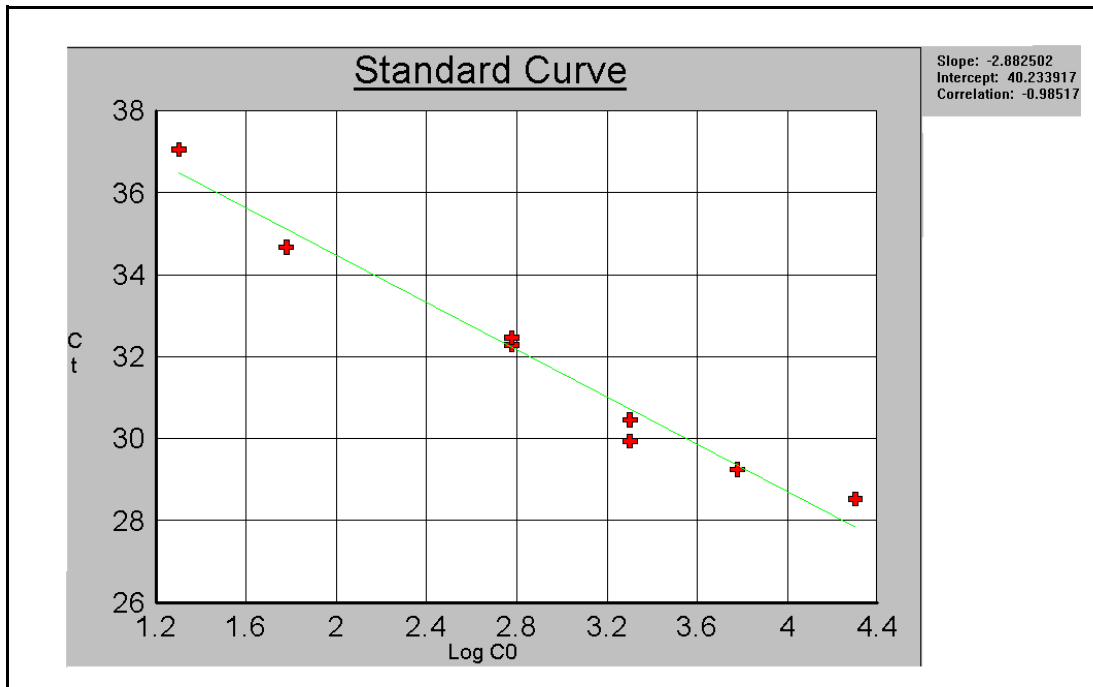
### Curva padrão HPV16



**Figura 6.** Curva padrão das amostras HPV 16 positivas com  $r = 0,988826$

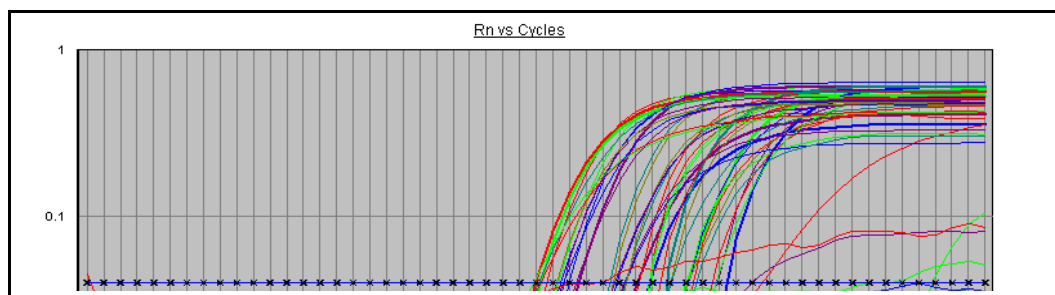


## Curva padrão HPV18



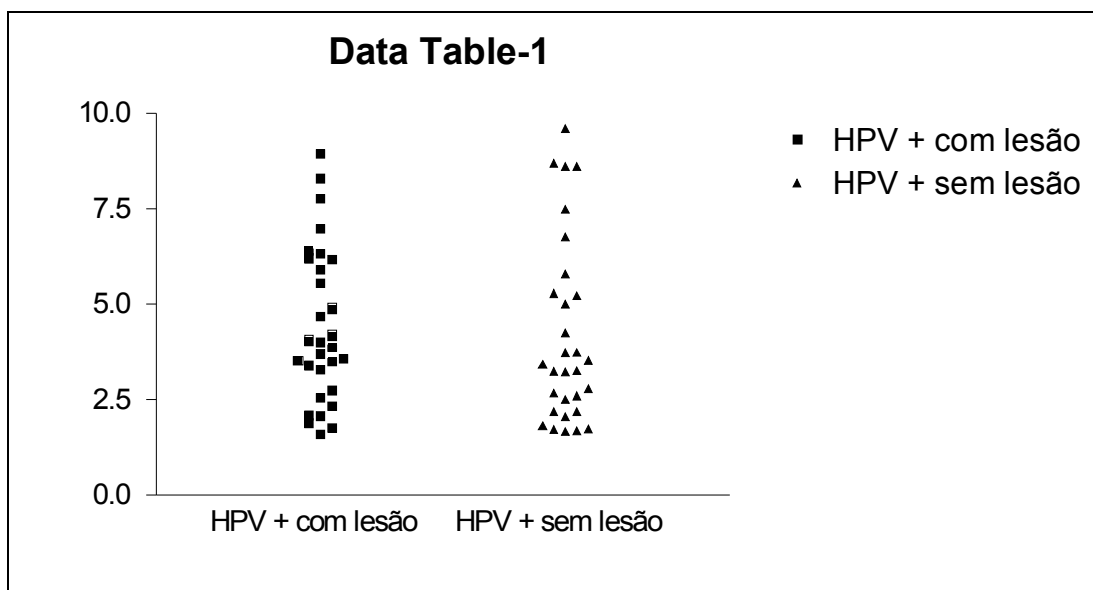
**Figura 7** .Curva padrão das amostras HPV 18 positivas com  $r = 0,985172$

A figura 8 mostra o início da amplificação das amostras que foi entre 12 e 31 Ct. O limite de detecção mínimo foi de 20 cópias por microlitro, resultado da boa qualidade do ensaio.



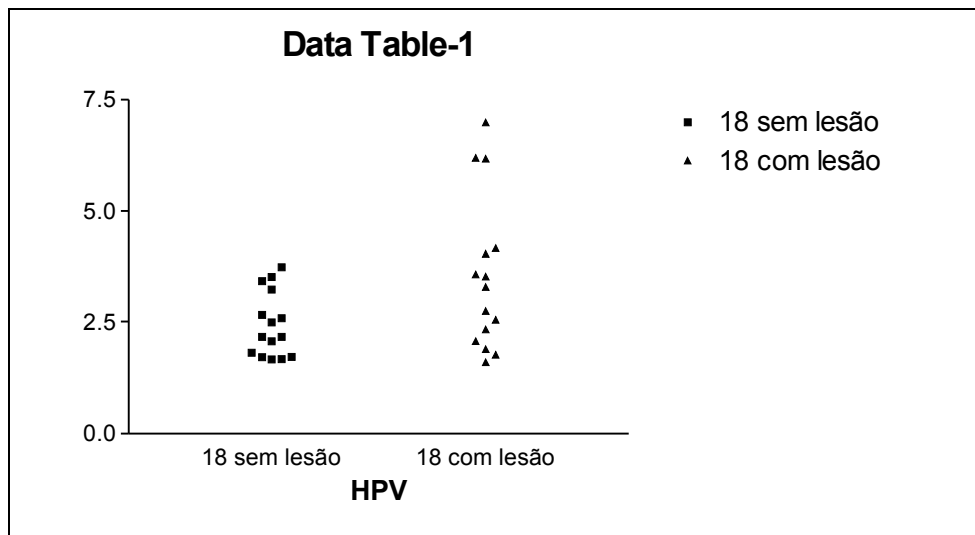
**Figura 8**. Início da amplificação das amostras

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1625$ ), com relação à frequência da seqüência do gene E7, entre o grupo de mulheres HPV positivas com *SIL* e o grupo sem lesões de colo uterino; pois o número de cópias da seqüência alvo foi semelhante para ambos os grupos, com poucas variações e não foram encontradas cópias de E7 nas amostras do grupo HPV negativo sem lesões. (figura 9)

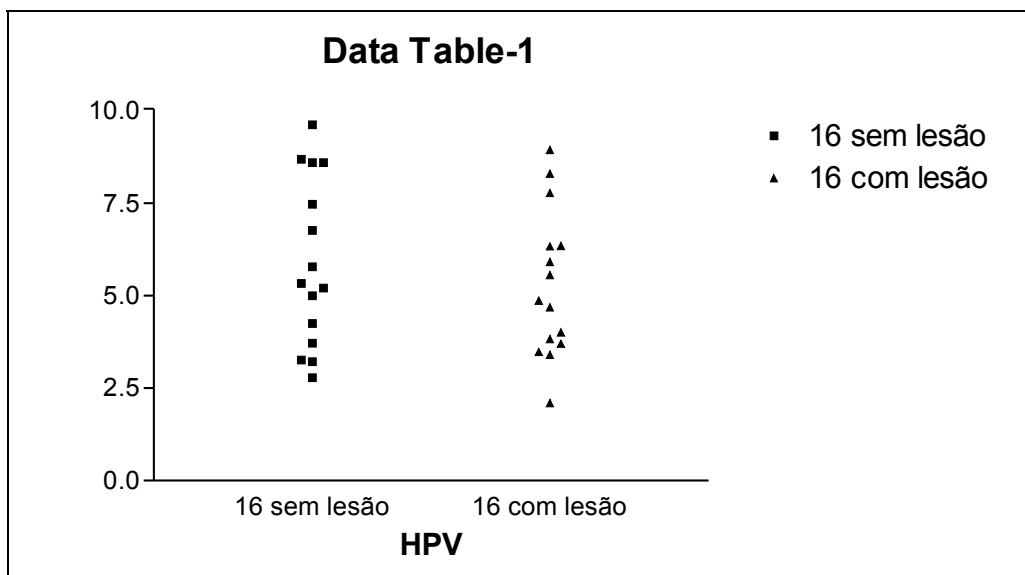


**Figura 9.** Referente à relação estatística entre amostras HPV positivas sem lesões de colo uterino e HPV positivas com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo

Contudo, quando separamos os dois grupos de amostras acima citados em quatro grupos (HPV16 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, HPV16 sem lesões de colo uterino, HPV18 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo e HPV18 sem lesões de colo uterino), foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para o subtipo HPV18 ( $p = 0,0129$ ), onde a quantidade de E7 é maior no grupo com lesões. Mas não foi encontrada diferença significativa ( $p = 0,4173$ ) entre os grupos para o subtipo HPV16 (figuras 10 e 11).

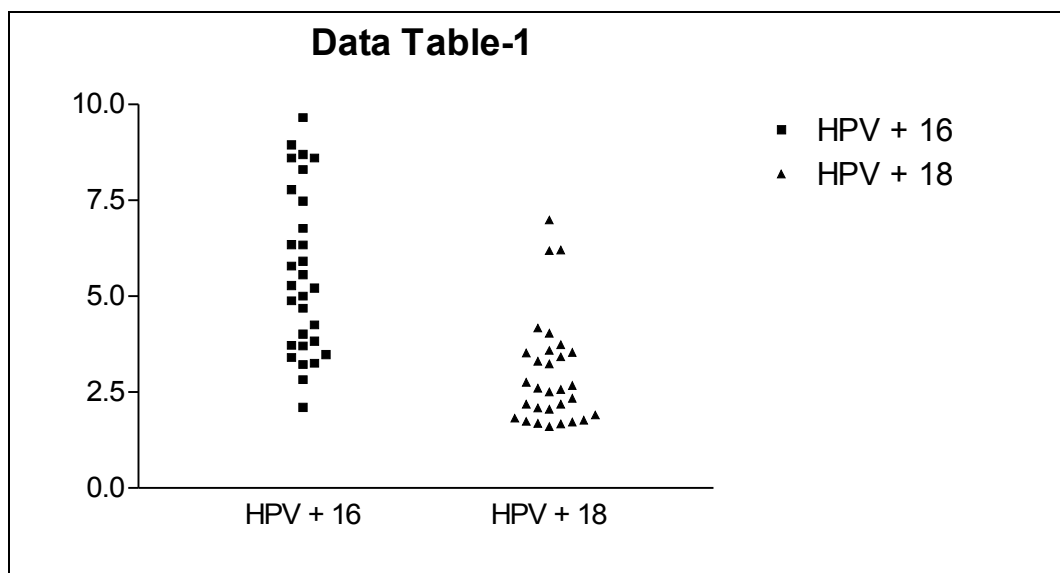


**Figura 10.** Diferença estatística entre os grupos de amostras com o subtipo HPV18 sem lesões de colo uterino e com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo



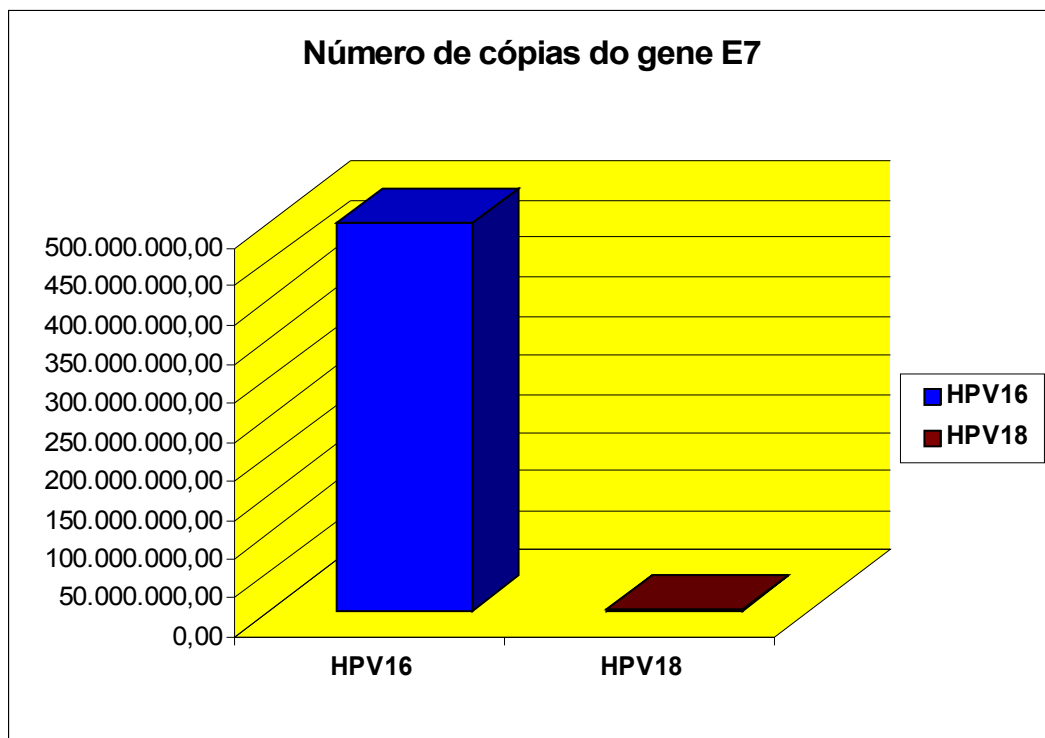
**Figura 11.** Diferença estatística entre os grupos de amostras com o subtipo HPV16 sem lesões de colo uterino e com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo

Quando foi feita a análise estatística entre os grupos de amostras, considerando-se apenas os tipos de HPV sem levar em conta se há lesão ou não de colo uterino, foram encontradas diferenças entre pacientes infectadas com HPV16 e HPV18  $p = 0,0062$  (figura 12).



**Figura 12.** Referente a diferença estatística entre as amostras HPV16 e HPV18

Nas amostras com HPV16, a quantidade em número de cópias do gene E7, é bastante superior às quantidades deste mesmo gene nas amostras infectadas pelo HPV18, como podemos ver na figura 13.



**Figura13.** Gráfico referente a diferença entre o número de cópias do gene E7, quantificadas nas amostras infectadas pelo HPV16 e HPV18, onde o valor médio equivale respectivamente 499.188.234,78 e 652.029,93



Segundo Boer *et al.* (2005) e outros autores, o HPV é a principal causa do câncer cervical. A presença do vírus HPV tipos 16 e 18 na mucosa do colo uterino aumenta a progressão do grau de *LSIL*. Entretanto essa lesão pode regredir espontaneamente na grande maioria dos casos (Nguyen *et al.*, 2005). Embora uma alta porcentagem de mulheres seja positiva para o HPV 16 a maioria das infecções provocadas por este vírus são subclínicas em pacientes imunocompetentes ou manifestam verrugas transitórias. Todavia, uma pequena mas importante, porcentagem das lesões provocadas pelo HPV progridem para *HSIL* e câncer cervical.

As pacientes que cederam suas amostras cérvico-vaginais para a execução deste trabalho fazem parte do ambulatório AMIGO, ou seja, são em sua maioria pacientes HIV positivas e apresentam infecções persistentes provocadas pelo HPV. Pacientes que possuem o sistema imunológico comprometido, como receptores de transplante renal, ou pacientes infectadas pelo HIV1, têm lesões que progridem mais rapidamente. Essas observações sugerem que a resposta imune é importante no controle da infecção pelo HPV e progressão para o câncer (Nguyen *et al.* 2005).

Segundo McMurray *et al.* 2001, todas as alterações provocadas pelo HPV são causadas por uma combinação de genes virais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. O gene E7, entre outras funções, afeta a transcrição dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular e/ou da diferenciação celular, desta forma induzindo a proliferação, imortalização e transformação celular.



Porque alguns tipos de HPV causam câncer? Tal feito reside na necessidade de que tanto as formas virais benignas como as malignas precisam estimular a progressão de G1 e a entrada da fase "S", para que ocorra a replicação dos seus genomas dentro da célula. Eles provavelmente conseguem esse feito, se sobrepondo de várias formas no andamento do ciclo celular. Os caminhos desfeitos pelos vírus oncogênicos podem levar a acidentes cromossômicos que podem causar as conversões malignas, da mesma forma que os caminhos modulados por tipos não oncogênicos resultam na obtenção dos objetivos virais com perturbações mínimas para a célula epitelial. O que difere um vírus oncogênico de um não oncogênico é, por exemplo, a interação da proteína E7, produzida pela ação do gene E7, com a proteína Rb, onde a afinidade de ligação do E7 oncogênico é maior que a proteína E7 do não oncogênico (O'Brien *et al.* 2002; McMurray *et al.* 2001).

Acreditávamos que quantificando o gene E7 poderíamos responder várias perguntas sobre a patogênese do HPV e que haveria uma diferença, com relação às quantidades deste gene E7, entre mulheres HPV positivas sem lesões de colo uterino e mulheres HPV positivas com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo. Entretanto, neste trabalho comprovamos que não há diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Contudo, separando esses dois grupos em quatro, HPV 16 sem lesões de colo uterino, HPV16 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, HPV18 sem lesões de colo uterino e HPV18 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, foram encontradas diferenças significantes entre os dois últimos

grupos de subtipo HPV18 ), onde a quantidade de E7 é maior no grupo com lesões.

Segundo Hajeer e Hutchinson. 2000, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina que está envolvida nas reações imunes celulares e inflamatórias. Na situação aguda, a produção local de TNF- $\alpha$  é benéfica, entretanto a exposição sistêmica ou prolongada ao TNF- $\alpha$  pode ser prejudicial (ex: choque tóxico e transtornos do metabolismo). O TNF- $\alpha$  pode também ter um efeito citotóxico sobre células tumorais, regulando substâncias importantes para a implantação tumoral, tendo desta forma uma função pró-tumorigênica. O genótipo TNF- $\alpha$  pode influenciar na resposta inicial à infecção viral, tal como na neutralização do vírus e sua eliminação.

As amostras utilizadas neste trabalho fazem parte daquelas tipificadas por Simões *et al.* (2003) para os microssatélites do gene TNF. Analisando as amostras já tipificadas, submetemos os quatro grupos (HPV 16 sem lesões de colo uterino, HPV16 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, HPV18 sem lesões de colo uterino e HPV18 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo) ao teste exato de *Fisher* para verificar a associação do microssatélite TNF-a com os tipos de HPV. Nessas análises encontramos diferenças significantes apenas nos grupos de subtipo HPV18, com relação aos alelos de TNF: 2 ( $p = 0,0024$ ), 6 ( $p = 0,0370$ ), 7 ( $0,0089$ ) e 10 ( $0,0370$ ).

Segundo Pociot *et al.* (1993), alguns alelos dos microssatélites TNF estão envolvidos na maior ou menor produção do TNF- $\alpha$ , entre eles os alelos TNF a2 e a6 estão respectivamente envolvidos na maior e menor

secreção desta citocina. Os nossos resultados estão de acordo com os autores acima, pois o alelo a2 foi encontrado em maior quantidade em amostras HPV18 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo (23%) e o alelo a6 foi encontrado em maior quantidade em amostras HPV18 sem lesões de colo uterino (14%).

Segundo Glahder *et al.* (2003), o potencial oncogênico que o vírus HPV de alto risco (principalmente os tipos 16, 18 e 31) possui é medido pela sua capacidade de produzir oncoproteínas.

Segundo Sotlar *et al.* (2004), os oncogenes de transcrição podem ser considerados como um risco para o desenvolvimento de *SIL* e progressão das *SIL* para o câncer cervical. Os oncogenes E6 e E7 possuem uma atividade transcripcional importante no desenvolvimento e manutenção da carcinogênese cervical encontrada nas células escamosas. Contudo, há diferenças consideráveis entre os tipos 16 e 18 no sentido de produção transcripcional. O HPV 16 possui dois receptores de ligação que geram três diferentes *transcripts*, possibilitando a produção de uma maior quantidade de proteínas. Enquanto que o HPV 18 possui apenas um receptor de ligação que gera apenas dois *transcripts* diferentes.

Biedermann *et al.* 2004, afirma que a quantidade de DNA viral presente no tumor pode representar um importante aspecto para o curso e poder da doença. Concordamos com o autor, neste aspecto, mas concordamos mais com os autores acima, pois em nosso trabalho encontramos uma diferença bastante significativa entre os tipos virais 16 e 18. Por todas as razões acima citadas, acreditamos que o tipo viral também

influencia bastante. O HPV16 apresenta maior quantidade de cópias do gene E7 do que o tipo 18, o que nos leva a entender o porque deste tipo de HPV ser mais relacionado ao prognóstico de evolução de *SIL* para câncer de colo uterino, e também ser considerado por muitos autores o tipo mais virulento (Boer *et al.* 2005; Fiedler *et al.* 2004; Sathish *et al.* 2004; Glahder *et al.* 2003).

A *PCR* em tempo real, que ao mesmo tempo amplifica e quantifica a seqüência de DNA ou RNA alvo, utiliza dois métodos gerais para a detecção quantitativa do *amplicom*: o sistema *Taqman* e o *Syber green*. Nagao S *et al.* (2002) desenvolveu um protocolo para quantificar o DNA do HPV 16, por *PCR* em tempo real, usando *Syber Green molecular probes* e teve bons resultados pelo método já estar bem padronizado e protocolado. Morberg *et al.* (2003) afirma que o sistema *TaqMan* é mais específico e sensível. As sondas *TaqMan* usam a atividade exonuclease fluorogênica 5' da *Taq* polimerase, para medir a quantidade de seqüências marcadas na amostra de DNA, se anelando à região interna do produto de *PCR*. Quando a polimerase amplifica a seqüência na qual a sonda *TaqMan* está ligada, sua atividade exonuclease 5' cliva a sonda. Esse feito finaliza a atividade do *quencher*, e o *reporter* começa a emitir fluorescência que aumenta a cada ciclo proporcionalmente, na razão da clivagem da sonda. O acúmulo dos produtos amplificados é detectado através do monitoramento do aumento na fluorescência do *reporter*. As sondas *TaqMan* originam amplificações específicas, porque a clivagem ocorre somente se a sonda hibridiza o alvo. Por essa razão este é um método bastante sensível e mais específico que o

*Syber Green*. Este tipo de *PCR* em tempo real, feito com *Molecular beacons*, apesar de possuir *reporter*, ao mesmo tempo que se adaptam em forma de pinça, ficam livres na solução para produzir a fluorescência, e o *quencher* se aproxima para produzir a fluorescência a ser detectada. Contudo, a proximidade do *reporter* e *quencher* em forma de pinça, inibe a fluorescência do *reporter*. Nesta análise utilizamos *Taqman primers* e *probes* para a quantificação do gene E7 do HPV16 e HPV18. Nossos resultados foram bastante satisfatórios, principalmente com relação a precisão da técnica, porém comprovamos que ainda é um procedimento bastante caro.

Em vários trabalhos feitos com *PCR* em tempo real, foram feitas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^6$  cópias de DNA utilizando água estéril. Neste presente trabalho, foram feitas diluições dos plamídeos de HPV 16 e 18 em DNA ultra puro de *Escherichia coli* (*Sigma*) para obter 20.000, 6.000, 2.000, 600, 200, 60, 20, 6 e 2 cópias de HPV por microlitro. Foi observada a amplificação até 20 cópias, não havendo amplificação nas amostras com 6 e 2 cópias por microlitro, o que comprova o auto grau de sensibilidade do método.



Desta forma concluímos que:

- Há diferença significativa ( $p = 0,0129$ ) entre as amostras HPV18 sem lesões de colo uterino e HPV18 com *LSIL* ou *HSIL* ou câncer cervical invasivo, com relação à quantidade do gene E7 que é maior no grupo com lesões.
- Há diferença significativa ( $p = 0,0062$ ) entre os tipos 16 e 18 com relação ao número de cópias do gene E7 encontrado nas amostras, independente da presença ou não de *SIL* ou câncer cervical invasivo.
- Futuras avaliações devem ser realizadas para se entender melhor a patogênese do vírus HPV.





- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, *et al.* Structural and transcriptional analyses of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61: 962-971
- Bettini JSR, Soares EG, Duarte G, *et al.* PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytologica* 2003; 47(4): 545-9
- Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, *et al.* Comparison of Real-Time PCR signal-amplified in Situ Hybridization and conventional PCR for detection and quantification of Human Papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 3758-65
- Boer MA, Peters LAW, Aziz MF, *et al.* Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands. *Gynecologic Oncology* 2004; 94: 488-494
- Boer MA, Peters LAW, AZIZ MF *et al.* Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer* 2005; 114: 422-425
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinhenz A, Scheurlen H, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984; **3**: 1151 – 1157
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193, 2000

- Dorak MT. Real time PCR. *Journal of molecular biology* 2002; 45, 33-40
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 3812 – 3814
- Fiedler M, Müller-Holzner E, Viertler HP, et al. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRB-levels in cervical biopsies. *FASEB Journal* 2004; 18(10):1120-2
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30: 503-512
- Gissmann L, Dürst M, Oltersdorf T, von Knebel DM. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Cancer cells* 1987; **5**: 275-280
- Glahder JA, Hansen CN, Vinther J et al. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *Journal of general Virology* 2003; 84: 3429-3441
- Hajeer AH and Hutchinson IV. TNF  $\alpha$  gene polymorphism: Clinical and biological implication. *Microscopic Research* 2000; 50: 216-228.
- Herrington CS. Do HPV-negative cervical carcinomas exist?—Revisited. *J Pathol.* 1999; 189:1-3.
- Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: *PCR technology* (H. A. Erlich, ed.), Stockton Press, New York, NY, USA, 1989.

- Howley PM, Lowy DR. Papillomavirus and their replication. In Field BN, Knipe DM (eds). Fields's virology, vol 2. New York: Raven Press, 2001; pp 2197-2229.
- IARC WORKING GROUP. Human papillomaviruses. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon - France 1995; 65
- Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K, *et al.* Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2003; 188(1):49-55
- Liu JS, Kuo SR, Broker TR, *et al.* The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. J Biol Chem 1995; 270: 27283-27291
- Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In Field BN, Knipe DM (eds). Fields's virology, vol 2. New York: Raven Press, 2001; pp 2231-2264
- Mackay IM.; Arden KE.; Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Research 2002; 30(6): 1292-1305.
- McCance DJ. Human papillomaviruses and cancer. Biochem Biophys Acta 1986; 823:195-205.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McCance DJ. Biology of human papillomaviruses. J Exp Path 2001; 82: 15-33
- Morberg M, Gustavsson I and Gyllensten U. Real-Time PCR-based system for simultaneous quantification of Human Papillomavirus types

- 
- associated with high risk of cervical cancer. *J. of Clinical Microbiology* 2003., 41 (7):3221-28
- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, et al. Rapid and sensitive detection of physical status of Human Papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *Journal of clinical Microbiology* 2002; 40 (3) 863-67
  - Niesters HGM. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification Techniques. *Methods* 2001; 25: 419-429
  - Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2005; 95: 452-461
  - O' Brien PM, Campo MS. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 2002; 88: 103-117
  - O' Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? *TRENDS in Microbiology* 2003; 11(7): 300-305
  - Peitsaro P, Johansson B and Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by novel quantitative real-time PCR technique. *J. of Clinical Microbiology* 2002; 40 (3)886-91
  - Piirsoo M, Ustav E, Mandel T, *et al.* Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 1996; 15: 1-11.
  - Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, *et al.* Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible

- 
- link to insulin-dependent diabetes mellitus. Eur Journal of Immunology 1993; 23: 224-231.
- Sanghinetti C, Dias, E.N, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. Biotechniques 1994; 17(5): 209-214
  - Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, *et al.* E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. Gynecologic Oncology 2004; 95: 363-369
  - Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. Natl Cancer Inst 1995; 87: 1345-1347
  - Schmittgen TD. Real – Time Quantitative PCR. Methods 2001; 383-385
  - Simoes RT, Bettini JS, Soares EG, *et al.* Tumour necrosis factor microsatellite association with human papillomavirus cervical infection. Molecular pathology 2003; 56: 305-6
  - Sotlar K, Stubner A, Diemer D, *et al.* Detection of High-Risk Human Papillomavirus E6 and E7 Oncogene Transcripts in Cervical Scrapes by Nested RT-Polymerase Chain Reaction. Journal of Medical Virology 2004; 74: 107-116
  - Stoler MH, Rhodes MH, Witbeck A, *et al.* Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. Hum Pathol 1992; 23: 117-128
  - Syrjänen KJ. Human papillomavirus (HPV) infections of female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Pathol Ann 1986; 21:53-89.

- Syrjänen KJ. Human papillomavirus (HPV) lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. *Obstet Gynecol* 1983; 62:617-622
- Ting Y, Manos M. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In *Polymerase chain reaction protocols: A guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, *et al*, eds. San Diego: Academic Press 1990
- Van Ranst MA, Tachezy R, Delius H, *et al*. Taxonomy of the human papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 1993; 3:61.
- Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 321-341
- Voglino, G. *et al*. The role of human papillomavirus in cyto-histological practice: distribution and prevalence of high-risk strains (16, 18, 31, 33, and 35) in intraepithelial lesions and neoplasia of the uterine cervix. *Pathologica* 2000; 92: 516-23
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, *et al*. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-19.
- Wilbur DC, Reichman RC, Stoler MH. Detection of infection by human papillomavirus in genital condylomata. A comparison study using immunocytochemistry and in situ nucleic acid hybridization. *Am J Clin Pathol* 1988; 89:505.
- Yang L, Li R, Mohr IJ, *et al*. Activation of BPV-1 replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Nature* 1991; 353: 628-632

- 
- zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, *et al.* Human papillomaviruses and cancer. *Biblioteca Hematologica* 1974; **43**: 569
  - zur Hausen H, De Villiers EM. Human Papilloma Viruses. *Annual Review of Microbiology*. 1994, Vol. 48, Pages 427-447





BETTINI, JSR. **QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES INFECTADAS POR HPV**. 2005. 103pgs. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O Papiloma vírus humano (HPV) é conhecido como agente etiológico do câncer de colo uterino. Há muitos anos sabe-se que o genoma do HPV persiste em tumores malignos. Porém, pouco se sabe sobre os determinantes de risco da infecção persistente do HPV. Estudos epidemiológicos tem indicado que quando uma mulher é persistentemente infectada por tipos oncogênicos de HPV, ela está mais susceptível para desenvolver câncer cervical, do que se estivesse sendo infectada transitoriamente. O gene E7 dos HPVs de alto grau oncogênico, principalmente HPV16 e o HPV18, atuam diretamente sobre os genes que regulam o crescimento celular, levando ao desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas (SIL - Squamous intraepithelial Lesions), que podem evoluir para câncer cervical invasor.

A PCR em tempo real é um método de detecção molecular, que utiliza-se de *primers* e sondas fluorogênicas para determinar a presença ou ausência de uma seqüência específica de DNA ou RNA em amostras clínicas e industriais, usando termocicladores para amplificar essas

seqüências de ácidos nucléicos e medir a concentração dos mesmos simultaneamente.

Foram coletadas sessenta amostras de esfregaço cérvico-vaginal, de mulheres infectadas pelo HPV, sem e com LSIL ou HSIL ou câncer cervical invasivo e 10 amostras de mulheres sadias, sem lesões de colo uterino. Nós observamos que nas amostras HPV16, a quantidade, em número de cópias do gene E7, é bastante superior às quantidades deste mesmo gene nas amostras infectadas pelo HPV18. Nessa análise também foram observadas diferenças significantes entre os grupos de amostras HPV18 sem lesões de colo uterino e HPV18 com LSIL ou HSIL ou câncer cervical invasivo, com relação ao número de cópias do gene E7 que é maior no grupo com lesões.

**Palavras-chave:** 1. HPV, 2. PCR em tempo Real, 3. Câncer cervical, 4. SIL, 5. Gene E7.



BETTINI, JSR. **ABSOLUTE QUANTIFICATION OF GENE E7 THROUGH REAL TIME PCR TECHNIQUE IN CERVICAL SAMPLES OF WOMEN INFECTED BY HPV**. 2005. 103p. Thesis (PhD in Experimental Pathology) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

It is known that human papillomavirus (HPV) is the etiological agent of cervical cancer and that its genome persists in malign tumors. In spite of that, little is known about the determinant factors of persistent infection by HPV. Epidemiologic studies indicate that when a woman is persistently infected by oncogenic types of HPV, she is more susceptible to develop cervical cancer than having transitory infections. Gene E7 from high oncogenic grade HPVs, mainly from HPV16 and HPV18, acts directly on genes that regulate cellular growth, leading to the development of SIL (Squamous Intraepithelial Lesions), which can evolve to an invasive cervical cancer.

Real Time PCR is a method of molecular detection that uses primers and fluorogenic probes to determine the presence or absence of specific DNA sequences or RNA sequences in clinical and industrial samples, using thermocyclers to amplify specific sequences of nucleic acids and measure their concentration simultaneously.

There were collected sixty samples of vaginocervical smears from women infected by HPV with or without LSIL (Low Squamous Intraepithelial Lesions) or HSIL (High Squamous Intraepithelial Lesions) or invasive cervical cancer and ten samples from healthy women, without cervical lesions. We

---

observed that in samples of HPV16, the quantity of gene E7 copies is higher than the quantities of the same gene in the samples infected by HPV18. In this analysis there were observed results significative among the samples groups HPV18 without SIL and HPV18 with LSIL or HSIL or invasive cervical cancer, regarded to the number of copies of gene E7 that is higher in the group with cervical lesions.

**Keywords:** 1. HPV, 2. Real time PCR, 3. Cervical Câncer, 4. SIL, 5. E7 Gen.



---

**12. ANEXOS**

## 12.1 Declaração do Comitê de Ética



CÓPIA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2002

Ofício nº 2560/2002  
CEP/SPC

**Prezada Senhora:**

O trabalho intitulado "**QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES E6 E E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES INFECTADAS POR HPV**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 139ª Reunião Ordinária realizada em 16/09/2002, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 1497/2002.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

  
**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**JUSSARA DE SOUZA RIBEIRO BETTINI**  
Depto. de Patologia - FMRP-USP  
Em mãos



## 12.2. Termo de Consentimento

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144  
CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO

##### **NOME DA PESQUISA:**

QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DO GENE E7 POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS CERVICAIS DE MULHERES INFECTADAS POR HPV

**PESQUISADORAS RESPONSÁVEIS:** Jussara de Sousa Ribeiro Bettini

##### **DESCREVER ABAIXO AS INFORMAÇÕES DADAS AOS PACIENTES SOBRE:**

- 1) A justificativa e o objetivo da pesquisa;
- 2) Os procedimentos que serão utilizados e seu propósito, bem como a identificação dos procedimentos que serão experimentais;
- 3) Os desconfortos e riscos esperados;
- 4) Os benefícios que se pode obter.

##### **AS INFORMAÇÕES SUPRA CITADAS DEVEM SER REDIGIDAS EM TERMOS SIMPLES CONHECIDOS PELAS PACIENTES E DE FORMA QUE POSSAM ENTENDER:**

Nesta pesquisa vamos analisar o seu sangue e esfregaço vaginal, para verificar se há alguma substância que faça com que as mulheres adquiram com mais facilidade a infecção por um vírus chamado HPV. Caso você concorde em participar desta pesquisa, faremos uma coleta do seu esfregaço vaginal e 3 a 5 ml de sangue, que serão analisados em laboratório. Se você autorizar, o restante do sangue colhido será estocado para futuros exames de outros componentes, sempre mantendo seu nome em sigilo.

Não há riscos para você, pois todo material utilizado é descartável e o desconforto é somente o da picada da agulha e o da nova coleta de citologia vaginal. Para você, o benefício será o da nova colheita de citologia, que poderá revelar o aparecimento da evolução da doença, caso você esteja infectada pelo vírus, que não tenha sido detectada na primeira citologia. Para nós, este é um estudo importante, pois ajudará a esclarecer possíveis relações entre infecção por HPV e genética.

Os resultados desta pesquisa estarão a disposição do seu médico, quando for concluída.

Você tem total liberdade de se recusar a participar desta pesquisa ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da mesma, sem prejuízo ao seu tratamento.

Você terá garantia de sigilo que assegure sua privacidade, pois somente o número da citologia é interessante para o nosso conhecimento. O seu nome não estará associado aos dados obtidos na pesquisa nem presente nos relatórios da mesma.

---

**PESQUISADORA RESPONSÁVEL**  
Jussara de Sousa Ribeiro Bettini

**EU** \_\_\_\_\_

**R.G:** \_\_\_\_\_ , **abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.**

- 1** - A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionamentos com a pesquisa e o tratamento a que serei submetida;
- 2** - A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- 3** - A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
- 4** - O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
- 5** - A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
- 6** - Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

**Tenho ciência do exposto acima e desejo fazer parte deste trabalho de pesquisa.**

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente

### **12.3. Protocolo de Extração de DNA**

- Homogeneizar a amostra de secreção cérvico-vaginal total lentamente
- Pipetar 300µl da amostra em cada eppendorf
- Pipetar no mesmo 1ml de tampão de Lise I (Tris/HCl 0,5M e pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 1M e Triton X-100 a 100%), homogeneizar no agitador, centrifugar e descartar o sobrenadante.
- Repetir essa lavagem no mínimo por 3 vezes
- Após a lavagem com lise 1, acrescentar o tampão de lise II (Tris/HCl 0,5M e pH 8,5, KCl<sub>2</sub> 1M, NP-40 a 100% e Tween-20 a 100%) + a proteinase K (esta vai digerir os restos das membranas). Agitar e levar para a estufa de 65° por 1 hora. Depois levar as amostras para a estufa de 37° *overnight*.
- Após o *overnight*, as amostras estão prontas para a PCR ou podem ser guardadas no freezer.

#### **12.4. Protocolo de Coloração**

- Depositar o gel de poliacrilamida em um recipiente limpo contendo 100ml de solução fixadora (50ml de etanol, 2ml de ácido acético e 300ml de H<sub>2</sub>O deionizada).
- Adicionar 1ml da solução de prata (AgNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O) a 10%, agitando por 5 minutos.
- Lavar em H<sub>2</sub>O corrente.
- Adicionar a solução reveladora (4,5g de NaOH, 1ml de formaldeído 37% e 200ml de H<sub>2</sub>O) agitar até observar o surgimento das bandas.
- Desprezar a solução reveladora e adicionar 100ml da solução fixadora, para fixar as bandas.

#### **12.5. Construção da Curva Padrão**

Segue abaixo os cálculos para a preparação de padrões com número de cópias de um determinado gene por  $\mu$ l de solução. Darei como exemplo os cálculos que utilizei para preparar os meus padrões.

1. Você deve saber o tamanho do plasmídeo e do inserto que você quer trabalhar.

EX : Plasmídeo pBR322 = 4.363 pb

Genoma completo de HPV16 = 8.000 pb

2. A seguir, você utiliza as relações abaixo :

1 célula =  $6,0 \times 10^9$  pb = 6,0 pg de DNA (dados extraídos da literatura)

pBR322 + HPV16 completo = 12.363 pb = 0,0123 fg de DNA =  $1,23 \times 10^{-8}$  ng

3. A partir dessas relações, você pode preparar o padrão que contém o maior número de cópias do seu alvo.

EX :

$1,23 \times 10^{-8}$  ng \_\_\_\_\_ 1 cópia

X \_\_\_\_\_  $10^5$  cópias

$X = 1,23 \times 10^{-3}$  ng = 1,23 pg/ $\mu$ l

4. Tendo a solução acima preparada, é só você diluí-la em um DNA sem HPV (DNA ultrapuro de *E. coli* - da Sigma) para obter os outros padrões de número de cópia. Abaixo está a forma com que eu preparo os meus padrões.

180  $\mu$ l ( $10^5$  cópias) + 720  $\mu$ l DNA de *E. coli* (2,5 ng/ $\mu$ l) = 20.000 cópias/ $\mu$ l

Se você tem uma solução contendo 100.000 cópias ( $10^5$  cópias) e quer obter uma outra com 20.000 cópias, você precisa diluí-la 5 vezes. Se você dividir 720 por 180, você terá 4 como resultado. Assim sendo, se você pegar uma parte da solução de  $10^5$  cópias e diluí-la em 4 partes de DNA de *E. coli*, você vai obter a solução diluída 5 vezes, conforme você desejava.

60  $\mu$ l ( $10^5$  cópias) + 940  $\mu$ l DNA de *E. coli* (2,5 ng/ $\mu$ l) = 6.000 cópias/ $\mu$ l

O raciocínio é o mesmo de cima.

A seguir, deve-se diluir serialmente cada padrão de nº de cópias 10 vezes, ou seja, 1 parte do padrão e 9 partes do DNA de *E. coli*.

50  $\mu$ l (20.000 cópias/ $\mu$ l) + 450  $\mu$ l DNA de *E. coli* (2,5 ng/ $\mu$ l) = 2.000 cópias/ $\mu$ l

50  $\mu$ l (2.000 cópias/ $\mu$ l) + 450  $\mu$ l DNA de *E. coli* (2,5 ng/ $\mu$ l) = 200 cópias/ $\mu$ l

50  $\mu$ l (200 cópias/ $\mu$ l) + 450  $\mu$ l DNA de *E. coli* (2,5 ng/ $\mu$ l) = 20 cópias/ $\mu$ l

---

$$50\mu\text{l} (20 \text{ cópias}/\mu\text{l}) + 450\mu\text{l DNA de } E.\text{coli} (2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}) = 2 \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

O raciocínio é o mesmo de cima.

$$50\mu\text{l} (6.000 \text{ cópias}/\mu\text{l}) + 450\mu\text{l DNA de } E.\text{coli} (2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}) = 600 \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

$$50\mu\text{l} (600 \text{ cópias}/\mu\text{l}) + 450\mu\text{l DNA de } E.\text{coli} (2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}) = 60 \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

$$50\mu\text{l} (60 \text{ cópias}/\mu\text{l}) + 450\mu\text{l DNA de } E.\text{coli} (2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}) = 6 \text{ cópias}/\mu\text{l}$$

Assim sendo a curva padrão é composta dos seguintes padrões :

20.000; 6.000; 2.000; 600; 200; 60; 20; 6; 2 cópias/ $\mu\text{l}$

OBS.: Usamos o DNA de *E. coli* porque é um DNA ultrapuro, com dosagem precisa e vendido comercialmente. Nada impede de se usar um outro DNA que não contenha HPV para preparar esses padrões. Não tem referência bibliográfica para isso porque é mais um cuidado estabelecido pelos laboratórios da Merck e que foi adotado no Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer (São Paulo - SP). Com relação à utilização de 9 padrões para produzir a curva padrão, também foi um excesso de cuidado, pois dois pontos são suficientes para determinar uma reta, utilizamos nove que variam de uma alta até uma carga viral bem baixa. Assim, temos padrões que representam a carga viral da grande maioria das amostras.

### 12.6. Tabela referente às 106 pacientes do HC-FMRP-USP

AMOSTRA	TIPO DE HPV	HIV	GRAU DE LESÃO
1	18	Negativo	-
2	16	Positivo	LSIL
3	16	Positivo	HSIL
4	16	Negativo	-
5	16	Positivo	HSIL
6	16	Negativo	HSIL
7	16	Positivo	HSIL
8	18	Positivo	INVASOR
9	16	Positivo	HSIL
10	18	Positivo	-
11	16	Negativo	-
12	18	Positivo	-
13	16	Positivo	HSIL
14	X	Positivo	HSIL
15	18	Negativo	LSIL
16	18	Negativo	-
17	16	Negativo	-
18	16	Negativo	-
19	16	Negativo	-
20	X	Negativo	HSIL
21	16	Negativo	-
22	16	Negativo	HSIL
23	16	Negativo	-
24	18	Negativo	LSIL
25	18	Positivo	-
26	18	Negativo	-
27	18	Positivo	LSIL
28	18	Negativo	-
29	18	Positivo	HSIL
30	16/18	Negativo	LSIL
31	16	Positivo	HSIL
32	X	Negativo	HSIL
33	18	Negativo	HSIL
34	18	Negativo	-
35	16	Negativo	HSIL
36	18	Negativo	HSIL
37	16/18	Positivo	HSIL
38	18	Negativo	HSIL
39	18	Negativo	LSIL

40	16/18	Negativo	-
41	16/18	Positivo	HSIL
42	16	Negativo	HSIL
43	18	Negativo	HSIL
44	16	Negativo	HSIL
45	18	Negativo	LSIL
46	16	Positivo	LSIL
47	16	Positivo	-
48	16/18	Positivo	-
49	X	Positivo	-
50	16	Negativo	-
51	X	Negativo	-
52	16	Positivo	LSIL
53	X	Negativo	LSIL
54	X	Negativo	HSIL
55	X	Negativo	HSIL
56	X	Negativo	LSIL
57	18	Negativo	-
58	16	Negativo	HSIL
59	18	Positivo	-
60	16	Positivo	LSIL
61	X	Negativo	HSIL
62	X	Negativo	HSIL
63	16/18	Negativo	HSIL
64	X	Positivo	HSIL
65	X	Positivo	-
66	16/18	Negativo	HSIL
67	X	Negativo	HSIL
68	X	Negativo	HSIL
69	16/18	Negativo	HSIL
70	X	Negativo	-
71	X	Negativo	INVASOR
72	18	Negativo	-
73	X	Positivo	-
74	X	Negativo	HSIL
75	16	Negativo	-
76	16	Negativo	-
77	18	Positivo	-
78	16	Negativo	-
79	X	Negativo	HSIL
80	16/18	Negativo	HSIL
81	X	Positivo	LSIL
82	X	Negativo	LSIL
83	X	Negativo	HSIL
84	16	Negativo	-
85	16	Negativo	HSIL
86	16	Negativo	-
87	X	Negativo	-
88	X	Positivo	-
89	16/18	Negativo	HSIL
90	X	Negativo	-
91	18	Positivo	-
92	X	Negativo	LSIL
93	18	Positivo	LSIL



94	X	Negativo	LSIL
95	X	Positivo	LSIL
96	16/18	Negativo	HSIL
97	16/18	Negativo	HSIL
98	18	Negativo	LSIL
99	18	Positivo	-
100	X	Negativo	-
101	18	Positivo	LSIL
102	18	Negativo	LSIL
103	16/18	Negativo	HSIL
104	18	Positivo	HSIL
105	16	Negativo	-
106	18	Positivo	-



2

Absolute quantification of gene E7 through Real Time PCR technique in cervical samples of women infected by HPV.

**JSR Bettini\***, **AL Ruiz\*\***, **BAL Fonseca\*\***, **RT Simões\***, **AL Simões\*\*\***, **CD Martinhago\*\*\*\***, **MTC Canas\*\*\*\***, **EG Soares\***

\*Department of Pathology, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\*\*Department of Clinical Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\*\*\*Department of Genetics, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

\*\*\*\* Paulista Research and Diagnostic Center, Ribeirão Preto Brazil

Correspondence to: Dr. EG Soares, Department of Pathology, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14040-030, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil ([egsoares@fmrp.usp.br](mailto:egsoares@fmrp.usp.br))

Key-words: Real Time PCR, Human Papillomavirus, Cervical Cancer, SIL, E7 Gen

## **ABSTRACT**

**Background/Aims:** Human Papillomavirus (HPV) is known to be the etiology of cervical cancer. E7 gen of high grade oncogenic HPVs, especially HPV16 and HPV18, act directly on genes that regulate cellular growth, leading to the development of precancerous lesions, which can evolve into invasive carcinoma.

**Methods:** There were collected sixty samples of vaginocervical smears from women infected by HPV, with or without cervical lesions and 10 samples of healthy women. The absolute quantification of gene E7 was performed through Real Time PCR technique, using primers and specific probes.

**Results:** We observed that in samples of HPV16, the quantity of gene E7 copies is higher than the quantities of the same gene in the samples infected by HPV18. In this analysis there were observed results significative among the samples groups

<sup>2</sup>

HPV18 without SIL and HPV18 with LSIL or HSIL or invasive cervical cancer, regarded to the number of copies of gene E7 that is higher in the group with cervical lesions.

**Conclusions:** In this analysis there observed there was more quantity of E7 gene copies in HPV18 samples group with SIL and the quantity of gene E7 copies is higher than the quantities of the same gene in the samples infected by HPV18

## **INTRODUCTION**

Human Papillomavirus (HPV) is known to be the etiologic agent of cervical cancer. Epidemiological and molecular studies performed in the last 20 years state that the infection by certain types of HPV is an event that precedes cervical neoplasia. Since many years it is known that the HPV genome is present in malignant tumors. [1] [2] [3] Despite that, little is known about the risk determinants of persistent infection by HPV. When a woman is persistently infected by oncogenic types of HPV, she is more susceptible to develop cervical neoplasia than another that was infected temporarily. [4] [5] [6] [7]

There are more than 120 types of HPV described nowadays. The HPV16 and HPV18 types are the most associated to Squamous Intraepithelial lesions (SIL) and invasive cervical cancer (invasive carcinoma). [8] All the cellular alterations induced by HPV infection are caused by a combination of functions from the viral genes. The oncogene E7 contributes directly to abnormal cellular growth typical of dysplastic lesions and carcinomas; besides, the amount of DNA present in the tumor may represent an important aspect in the course of the disease. [9] [10] The quantification of this protein in cervical samples of women infected by HPV may favor the prognosis of lesions induced by the virus.

Real time PCR detects a fluorescent sign produced during the amplification of PCR product. TaqMan probe is labeled at the 5' end with a reporter fluorochrome

<sup>2</sup>  
(FAM) and a quencher fluorochrome (TAMRA) added at the 3' end. The probe anneals to the labeled sequence between the sites of primers forward e reverse, generating a substrate that is cleaved by the activity 5'of Taq DNA Polimerase. This process just occurs if the target is amplified. [11] [12]

The present study evaluated the frequency of gene E7 among women infected by HPV16 and 18 with LSIL (Low Squamous Intraepithelial Lesions) or HSIL (High Squamous Intraepithelial Lesions) or Invasive cervical cancer and women without SIL, with the purpose of favour the prognosis of lesions induced by HPV as well as to better understand the pathogenesis of these diseases.

## **CASUISTIC AND METHODS**

### **Clinical sample and DNA extraction**

Seventy samples obtained from patients of Hospital das Clínicas, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo were analyzed. There were collected vaginocervical smears from women infected by HPV with or without cervical lesions. The samples were divided into three groups: group A (30 samples from positive HPV patients without cervical lesions), group B (30 samples from positive HPV patients with LSIL or HSIL or invasive cancer) and a negative control group (10 samples of negative HPV patients without cervical lesions). The DNA extraction of the samples was performed according to Higuchi (1989). [13]

### **Polimerase Chain Reaction (PCR):**

HPV diagnosis and typing was performed through PCR technique according to Bettini et al (2003). [14]

### **Real time PCR:**

2

The samples were submitted to Real Time PCR for absolute quantification of gene E7 in the patients infected by HPV16 and 18. The DNA of gene E7 from HPV16 and 18 was quantified by a system of DNA detection *DNA Gene Amp 5700* (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). PCR mix consisted of 3µl of DNA, 12,5µl of 2X universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 8,75µl of sterile water, 0,5µl of primer forward (10uM) e 0,5µl of primer reverse (10uM) and 0,5µl of TaqMan probe TAMRA (5uM) with a total volume of 25µl. The primer sequences were selected using Primer Express software (version 1.0), (Applied Biosystems) (Table1).

Table 1. Primers e specific probes

HPV16E7-96F	AGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT
HPV16E7-182R	CACTTGCAACAAAACGTTACAATATTG
HPV16E7-122T	6FAMCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACATAMRA
HPV18E7-2F	TGCATGGACCTAAGGCAACA
HPV18E7-78R	TAGAAGGTCAACCGGAATTTTCATT
HPV18E7-23T	6FAMTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCCCTAMRA

The amplification was performed at 50°C for 2 minutes and initial denaturation for 10 minutes at 95°C, followed by 55 cycles at 94°C for 15 seconds and at 60°C for 1 minute. The standard curve was obtained through amplification of serial dilutions of two clones of HPV16 and HPV18 in vector pBR322 (donated by Dr. Ethel Michelle de Villiers, German Cancer Center, Heidelberg, Germany).

### Standard Curve

The standard curve correspondent to the types HPV16 and 18, essential to absolute quantification of gene E7, was built from serial dilutions, performed in two clones containing the vector PBR322 and the complete genome of HPV16 and HPV18 (donated by Dr. Ethel Michelle de Villiers, German Cancer Center,

---

2

Heidelberg, Germany), using ultra pure DNA of *Escherichia coli*. With the titulation there were obtained 20.000, 6.000, 2.000, 600, 200, 60, 20, 6 e 2 copies/ $\mu$ l of sample for each type of HPV.

### **Analysis of Real time PCR results**

The analysis was performed observing the relationship between the amount of DNA and Ct (threshold cycle-beginning of fluorescence detection). The higher the Ct, the higher was the amount of DNA. Both samples with HPV16 and 18 had Ct from 12 to 31.

### **Statistical analysis.**

The statistical analysis was performed using Wilcoxon test from InStat program version 4.0 (Graph Pad Software, USA), based on the amount of copies from gene E7 in the samples, to verify the difference among the groups of HPV positive patients with SIL, positive group without lesions and negative group without lesions, with significance of  $P < .0,05$ .

### **RESULTS.**

The correlation coefficients for HPV16 and 18 were respectively  $r = 0,988826$  and  $r = 0,985172$ , indicating good quality in the standards. The minimal limit of detection was of 20 copies/ $\mu$ l, resulting in good quality of the assay. There was no statistical difference between HPV positive group with and without lesion in regard to the frequency of E7 gene sequence ( $p = 0,1625$ ) and there were not found E7 copies in the samples of HPV negative group without lesions. However when we separated this two HPV positive groups in four (HPV16 with LSIL or HSIL or invasive cervical cancer, HPV16 without lesions, HPV 18 with LSIL or HSIL or

---

<sup>2</sup>

invasive cervical cancer and HPV18 without lesions) and verify the difference among this groups, we observed results significative among the samples groups HPV18 ( $p = 0,0129$ ). There was more quantity of E7 gene copies in HPV18 samples group with SIL. In the samples group HPV16 there was no statistical difference significative ( $p = 0,4173$ ). There were found differences between infected samples with HPV16 and 18 ( $p = 0,0062$ ). In the samples with HPV16, the amount of copies of gene E7 is higher than the amount of the same gene in the samples infected by HPV 18.

## DISCUSSION

Boer *et al.* [15] as well as other authors stated that HPV is the main cause of cervical cancer. The presence of HPV types 16 and 18 in cervical mucosa increases the progression of LSIL. Nevertheless this lesion may disappear spontaneously in the great majority of the cases [16]. Despite the fact that a high percentage of women are positive to HPV 16, the majority of the infections caused by this virus are subclinical in immunocompetent patients or show transitory warts. Even so, a small percentage of these lesions caused by HPV progress to HSIL and cervical cancer.

The vaginocervical smears to perform this investigation were from HIV positive women from AMIGO ambulatory, which presented persistent infections caused by HPV. Patients that possess compromised immunologic system like renal transplanted and HIV1 infected ones, have lesions that progress more rapidly. These observations suggest that immune response is important to infection control by HPV and progression to cancer [16].

In agreement to McMurray *et al.* [9], all the disturbances caused by HPV are from a combination of the viral genes E1, E2, E4, E5, E6 and E7. The gene E7,



---

2

among other functions, affect the transcription of genes involved in the progression of cellular cycle and/or cellular differentiation, inducing cellular proliferation, immortalization and transformation.

Why do some types of HPV cause cancer? This effect resides in the need of some benign and malign viral forms to stimulate the progression of G1 and the beginning of fase S, to replicate their genomas inside the cells. They probably achieve this objective affecting the cellular cycle in many ways. The disarranged pathways caused by oncogenic virus can achieve cromossomical accidents that lead to maligne conversions, in the same way that pathways modulated by non-oncogenic types result in the obtention of viral objectives with minimal disturbance to epithelial cells. The difference between an oncogenic and a non-oncogenic virus is, for example, the interaction between protein E7, produced by gene E7 action, and the protein Rb: the bonding affinity of oncogenic E7 is higher than the protein E7 of non-oncogenic ones. [9] [17]

We believed that quantifying gene E7 could answer several questions about the pathogenesis of HPV and that there would be a difference regarded to the quantities of gene E7, among HPV positive women without cervical cancer and HPV positive women with *LSIL* or *HSIL* or invasive cervical cancer. Nevertheless, in this report we proved that there is no significative difference between these groups. Despite of that, separating these two groups in four (HPV 16 without cervical lesions, HPV16 with LSIL or HSIL or invasive cervical cancer, HPV18 without cervical lesions and HPV18 with LSIL or HSIL or invasive cervical cancer) there were found significant differences between the last two groups of subtype HPV18, where the quantity of E7 is higher in the groups with lesions.

2

TNF- $\alpha$  is a cytokine involved in inflammatory and cellular immune reactions ones. [18] In an acute situation, the local production of TNF- $\alpha$  is beneficial, but systemic or prolonged exposition to TNF- $\alpha$  can be injurious (ex: toxical shock and metabolic disturbance). TNF- $\alpha$  may have a citotoxic effect on tumoral cells, regulating important substances to tumoral implantation, having a pro-tumorigenic function. The TNF- $\alpha$  genotype can influence the initial response to viral infection, neutralizing and eliminating the virus.

The samples utilized in this investigation are part of those classified by Simões *et al.* [19] of microsatellites of gene TNF. Analyzing the samples already typified, we submitted the four groups to Fisher's test to verify the association of TNF- $\alpha$  microsatellites with the types of HPV. In this analysis we found significative differences in the groups of subtype HPV18 regarded to the alleles of TNF 2 ( $p = 0,0024$ ), 6 ( $p = 0,0370$ ), 7 ( $0,0089$ ) and 10 ( $0,0370$ ).

Pociot *et al.* [20] stated that some alleles from TNF microsatellites are involved in a higher or less production of TNF- $\alpha$ , among them the alleles TNF a2 and a6 respectively. Our results are in agreement with these authors, because the allele a2 was found in greater quantity in samples HPV18 with *LSIL* or *HSIL* or cervical cancer (23%) and the allele a6 was found in higher quantities im samples HPV18 without cervical lesions (14%).

Glahder *et al.* [21] stated that the oncogenic potencial of high risk HPV (mainly types 16, 18 and 31) is measured by its capacity of producing oncoproteins.

Transcription oncogenes may be considered as a risk for the development of SIL and the progression of SIL to cervical cancer [22]. The oncogenes E6 and E7 possess an important transcriptional activity in the development and maintenance of cervical carcinogenesis found in squamous cells. The HPV 16 possess two bonding

---

2

receptors that generate three different transcripts, favouring the production of more proteins whereas HPV18 possess only one bonding receptor that generates only two transcripts.

Biedermann *et al.* [10] stated that the quantity of viral DNA present in the tumor may represent an important aspect to the course and power of the disease. We agree with the authors because in our investigation we found a significant difference between the viral types 16 and 18. For all the stated reasons, we believe that viral type also influences. The HPV16 presents more copies of gene E7 than type 18, which can take us to understand why this type of HPV can be more related to the evolution prognosis of *SIL* to cervical cancer, and also be considered by several authors the most virulent type. [15][21][23][24] PCR real time, which amplifies and quantifies the DNA or target RNA sequences, uses two methods for quantitative detection of *amplicom*: the *Taqman* and *Syber green systems*. Nagao *et al.* [25] developed a protocol to quantify the DNA of HPV 16 through PCR real time, using *Syber Green molecular probes* and obtained good results because of the well standardized method. Morberg *et al.* [4] stated that *TaqMan* system is more specific and sensitive. *TaqMan* probes use the activity of exonuclease fluorogenic 5' of *Taq* polymerase to measure the quantities of marked sequences in DNA samples, annealing to the internal region of PCR product. When the polymerase amplifies the sequence where the *Taqman* probe is bonded, its exonuclease 5' activity cleaves the probe. This finalizes the activity of the *quencher*, and the *reporter* starts to emit fluorescence increasing in each cycle proportionally, in the reason of the probe cleavage. The accumulation of the amplified products is detected through monitoring the increase of *reporter* fluorescence.

2

The *TaqMan* probes create specific amplification, because the cleavage occurs only if the probe hybridizes the target. For this reason it is a sensitive method and more specific than *Syber Green*. This type of PCR real time, performed with *Molecular beacons* and possessing the *reporter*, the same time that they adapt in the shape of a hairpin, they stay free in the solution to produce the fluorescence and the quencher approximates to produce the fluorescence to be detected. Nevertheless, the proximity of the *reporter* and *quencher* in the shape of a hairpin, inhibits the *reporter fluorescence*. In this analysis we used *Taqman primers and probes* to quantify gene E7 from HPV16 and HPV18. Our results were satisfactory, mainly regarded to the technique precision, even though being a expensive procedure.

Several investigations performed with PCR real time used the dilutions of  $10^1$  to  $10^6$  copies of DNA with esterile water. In the present investigation there were performed dilutions of the HPV plasmids 16 and 18 in ultrapure DNA of *Escherichia coli* (*Sigma*) to obtain 20.000, 6.000, 2.000, 600, 200, 60, 20, 6 and 2 copies of HPV by microliters. It was observed amplification until 20 copies, with no amplification in the samples with 6 and 2 copies, which proves the high sensitivity of this method.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Ethel Michelle de Villiers, German Cancer Center, Heidelberg, Germany for the clones, Andrea Trevisan, Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo-Brasil for technical assistance and Capes and Fapesp for financial support.

## REFERENCES

---

2

1. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S, *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *International Journal of Cancer* 1992;52:743-49.
2. zur Hausen H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology* 1996;122:3-13.
3. Villa LL. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res* 1997;71:321-341.
4. Morberg M, Gustavsson I and Gyllensten U. Real-Time PCR-based system for simultaneous quantification of Human Papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J. of Clinical Microbiology* 2003., 41 (7):3221-28
5. Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995; 76:1888-901
6. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
7. Voglino G, Poso F, Privitera S, *et al.* The role of human papillomavirus in cyto-histological practice: distribution and prevalence of high-risk strains (16, 18, 31, 33, and 35) in intraepithelial lesions and neoplasia of the uterine cervix. *Pathologica* 2000;92:516-23.
8. Peitsaro P, Johansson B and Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by novel quantitative real-time PCR technique. *J. of Clinical Microbiology* 2002; 40 (3)886-91.
9. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McCance DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001;82:15-33.
10. Biedermann K, Dandachi N, Trattner M, *et al.* Comparison of Real-Time PCR signal-amplified in Situ Hybridization and conventional PCR for detection and

---

2

quantification of Human Papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol* 2004;42:3758-65.

11. Grove DS. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems division 7700 sequence detector. *J Biomol Tech* 1999;10:11-16.

12. Mackay IM.; Arden KE.; Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 2002; 30(6): 1292-1305.

13. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: PCR technology (H. A. Erlich, ed.), Stockton Press, New York, NY, USA, 1989.

14. Bettini JSR, Soares EG, Duarte G, et al. PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. *Acta Cytologica* 2003;47:545-9

1. Boer MA, Peters LAW, AZIZ MF et al. Human papillomavirus type 18 variants: Histopathology and E6/E7 polymorphisms in three countries. *International Journal of Cancer* 2005; 114: 422-425

2. Nguyen HH, Broker TR, Chow LT, et al. Immune responses to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2005; 95: 452-461

3. O' Brien PM, Campo MS. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 2002; 88: 103-117

4. Hajeer AH and Hutchinson IV. TNF  $\alpha$  gene polymorphism: Clinical and biological implication. *Microscopic Research* 2000; 50: 216-228.

5. Simoes RT, Bettini JS, Soares EG, et al. Tumour necrosis factor microsatellite association with human papillomavirus cervical infection. *Molecular pathology* 2003; 56: 305-6

---

2

6. Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, *et al.* Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur Journal of Immunology* 1993; 23: 224-231.
7. Glahder JA, Hansen CN, Vinther J *et al.* A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *Journal of general Virology* 2003; 84: 3429-3441
8. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, *et al.* Detection of High-Risk Human Papillomavirus E6 and E7 Oncogene Transcripts in Cervical Scrapes by Nested RT-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Medical Virology* 2004; 74: 107-116
9. Fiedler M, Müller-Holzner E, Viertler HP, *et al.* High level HPV-16 E7 oncoprotein expresión correlatos with reduced pRB-levels in cervical biopsias. *FASEB Journal* 2004; 18(10):1120-2
10. Sathish N, Abraham P, Peedicayil A, *et al.* E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. *Gynecologic Oncology* 2004; 95: 363-369
11. Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, *et al.* Rapid and sensitive detection of physical status of Human Papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *Journal of clinical Microbiology* 2002; 40 (3) 863-67.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)