

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE TIPAGEM DO HPV POR MEIO DE  
AMPLIFICAÇÃO POR PCR USANDO-SE INICIADORES TIPO-ESPECÍFICOS E  
POR SEQUENCIAMENTO DIRETO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Nara de Oliveira Carvalho

Belo Horizonte - MG

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

NARA DE OLIVEIRA CARVALHO

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE TIPAGEM DO HPV POR MEIO DE  
AMPLIFICAÇÃO POR PCR USANDO-SE INICIADORES TIPO-ESPECÍFICOS E  
POR SEQUENCIAMENTO DIRETO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Geraldo Brasileiro Filho

Co-orientador: Prof. Victor Hugo de Melo

Belo Horizonte - MG

2009

C331c Carvalho, Nara de Oliveira.  
Comparação dos métodos de tipagem do HPV por meio de amplificação por PCR usando-se iniciadores tipo-específicos e por sequenciamento direto do produto amplificado [manuscrito]. / Nara de Oliveira Carvalho. - - Belo Horizonte: 2009.  
121f.: il.  
Orientador: Geraldo Brasileiro Filho.  
Co-orientador: Victor Hugo de Melo.  
Área de concentração: Patologia Geral.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Infecções por Papillomavírus. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Estudo Comparativo. 4. Doenças Virais Sexualmente Transmissíveis. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Brasileiro Filho, Geraldo. II. Melo, Victor Hugo. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 200




**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**


Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Geraldo Brasileiro Filho, Victor Hugo de Melo, Márcia Antoniazi Michelin e Annamaria Ravara Vago, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE TIPAGEM DO HPV POR MEIO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR USANDO-SE INICIADORES TIPO-ESPECÍFICOS E POR SEQUENCIAMENTO DIRETO DO PRODUTO AMPLIFICADO”**, apresentada pela mestrand **NARA DE OLIVEIRA CARVALHO** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 06 de fevereiro de 2009.

  
Prof. Geraldo Brasileiro Filho  
Orientador

  
Prof. Victor Hugo de Melo  
Co-orientador

  
Profa. Márcia Antoniazi Michelin

  
Profa. Annamaria Ravara Vago



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpg@medicina.ufmg.br](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **NARA DE OLIVEIRA CARVALHO**, nº de registro 2007652441. Às treze horas do dia **seis do mês de fevereiro de dois mil e oito**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE TIPAGEM DO HPV POR MEIO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR USANDO-SE INICIADORES TIPO-ESPECÍFICOS E POR SEQUENCIAMENTO DIRETO DO PRODUTO AMPLIFICADO”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da comissão, Prof. Geraldo Brasileiro Filho, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Geraldo Brasileiro Filho/Orientador  
Prof. Victor Hugo de Melo/Co-orientador  
Profa. Márcia Antoniazzi Michelin  
Profa. Annamaria Ravara Vago

Instituição: UFMG  
Instituição: UFMG  
Instituição: UFTM  
Instituição: UFMG

Indicação: Aprovada  
Indicação: Aprovado  
Indicação: Aprovado  
Indicação: Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2009.

Prof. Geraldo Brasileiro Filho/Orientador Geraldo Brasileiro Filho

Prof. Victor Hugo de Melo/Co-orientador Victor Hugo de Melo

Profa. Márcia Antoniazzi Michelin Márcia Antoniazzi Michelin

Profa. Annamaria Ravara Vago Annamaria Ravara Vago

Prof. Wagner Luiz tafuri/Coordenador Wagner Luiz tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

*Aos meus pais com muito amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Albênio e M<sup>a</sup> de Fátima, pelo incentivo constante, dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas. O meu muito obrigado por tudo aquilo que me têm transmitido e que ainda continuam a transmitir, por todos os valores que só se adquirem com uma boa educação.

Ao meu marido, Hudson, um companheiro para todas as horas, pelo incentivo e constante apoio. Obrigada por suportar todos os meus momentos de tensão e minha falta de tempo para você!

Ao meu orientador, Geraldo Brasileiro Filho, por sua confiança e credibilidade na minha pessoa, dedicação e comprometimento na realização deste trabalho. Minha especial gratidão.

Ao professor Victor Hugo de Melo, pelo exemplo de dedicação à pesquisa, incentivo e co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. José Nélio Januário, diretor Geral do NUPAD, pelo constante incentivo à pesquisa e pelo apoio, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

A Dra. Dora Mendez del Castillo, coordenadora do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, pela confiança, apoio e constante aprendizado, exemplo de competência e profissionalismo. A minha eterna admiração.

Ao Carlos Perone, supervisor do setor de biologia molecular do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, pelos conhecimentos e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Arminda Siqueira Campos e Jacqueline Tibúrcio, pela contribuição ao desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela dedicação e empenho que demonstraram no decorrer de suas atividades.



A Gena, grande amiga e colega de trabalho, obrigada pelo convívio diário e pela sua amizade, a qual tem sido muito importante para mim.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos os meus queridos familiares, que, apesar da distância, estão sempre presentes nos momentos importantes da vida. Obrigada pelo apoio e compreensão de minha ausência.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

*“Somos indigentes e incultos. Mas isto não é o principal. O principal é a consciência da necessidade de estudar e o desejo de estudar... E nós temos esta consciência e este desejo. Por isso vamos estudar e havemos de aprender.”*

*V. I. Lenin, 1922*

## RESUMO

A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é a doença viral sexualmente transmissível mais frequente em todo o mundo, sendo os tipos virais de alto risco associados à carcinogênese cervical. Embora existam vários métodos para tipagem viral, o melhor teste ainda é motivo de investigação. Este estudo comparou a eficácia da PCR tipo-específica e do sequenciamento visando sua aplicação clínica. Foram estudadas 260 amostras cervicais de pacientes HPV-positivas por meio de PCR tipo-específica para os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 e sequenciamento. Identificou-se o genótipo em 36% dos casos pela PCR tipo-específica e em 75% pelo sequenciamento. A probabilidade de o sequenciamento identificar o tipo viral presente em amostras positivas foi quatro vezes maior do que a PCR tipo-específica ( $p=0,00$ ). Apesar de o sequenciamento ser mais eficaz para a genotipagem do vírus, o método não consegue identificar os tipos virais nas infecções múltiplas. A combinação dos dois métodos alcançou alta sensibilidade de detecção (87%), mostrando serem métodos complementares. Com base nestes resultados, para a genotipagem em amostras clínicas propõe-se aplicar inicialmente o sequenciamento e, se necessário, nos casos de infecção múltipla, a PCR tipo-específica. A genotipagem do HPV é importante por orientar a busca de tipos específicos a serem pesquisados nos testes rotineiros, permitir a seleção das pacientes com maior risco de desenvolver câncer cervical e contribuir para o desenvolvimento de vacinas tipo-específicas.

Palavras-chave: HPV, PCR, Sequenciamento, Tipagem

## ABSTRACT

The infection by human papilloma virus (HPV) is the most common sexually transmitted disease worldwide, with high-risk viral types associated to cervical carcinogenesis. Although there are several virus typing methods, the best test is still under investigation. This study has compared the effectiveness of type-specific PCR and sequencing aiming at their clinical application. Two hundred and sixty cervical samples of HPV-positive patients were studied by type-specific PCR for types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35 and sequencing. Genotype was identified in 36% of cases by type-specific PCR and in 75% by sequencing. Sequencing was four times more likely to identify the viral type present in positive samples than type-specific PCR ( $p=0.00$ ). In spite of sequencing being more effective for virus genotyping, this method cannot identify viral types in multiple infections. By combining both methods, we reached a highly sensitive detection (87%), showing that they are complementary methods. Based on these results, in order to genotype clinical samples we propose to start with sequencing and, if necessary, in cases of multiple infections, type-specific PCR should be performed. HPV genotyping plays an important role in guiding the search for specific types to be investigated in routine tests, to allow selecting patients with a higher risk of developing cervical cancer and to contribute to develop type-specific vaccines.

Keywords: HPV, PCR, Sequencing, Typing

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Classificação do HPV com base na homologia da sequência de DNA da região L1 em 118 genótipos .....	23
FIGURA 2: Árvore filogenética mostrando os tipos de PV identificados até 2004 .....	24
FIGURA 3: Representação esquemática do genoma do HPV .....	25
FIGURA 4: Mecanismos da carcinogênese pelo HPV .....	27
FIGURA 5: Etapas do ciclo celular do HPV .....	29
FIGURA 6: Número de publicações referentes ao HPV e o câncer cervical nas últimas décadas .....	36
FIGURA 7: Associação do HPV com o câncer cervical aumenta à medida que se utilizam metodologias mais sensíveis .....	37
FIGURA 8: Testes moleculares e o grau de sensibilidade .....	43
FIGURA 9: Princípio da Reação em Cadeia da Polimerase .....	46
FIGURA 10: Tamanho do produto amplificado pelos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+ no genoma do HPV .....	47
FIGURA 11: Sala de extração – capela de fluxo laminar onde é realizada a extração de DNA .....	56
FIGURA 12: Sala de documentação - Sistema de captura digital para documentação dos géis tratados com brometo de etídio .....	60
FIGURA 13: Sala de pós amplificação - Sequenciador automático .....	66
FIGURA 14: Gel representativo da amplificação do fragmento de 204pb do gene da globina .....	68
FIGURA 15: Géis representativos da amplificação dos fragmentos genéricos da região L1 do genoma do HPV .....	69
FIGURA 16: Gel representativo da amplificação por PCR tipo-específica do fragmento do HPV16 .....	73
FIGURA 17: Eletroferogramas. (A) Infecção simples. Sequência nucleotídica referente ao HPV 70. (B) Infecção múltipla. Sobreposição de sequências virais..	74

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Número de casos em relação ao tipo de infecção .....	70
GRÁFICO 2: Frequência dos tipos de HPV identificados no estudo .....	70
GRAFICO 3: Genotipagem do HPV pela PCR tipo-específica .....	72
GRAFICO 4: Genotipagem do HPV pelo sequenciamento .....	74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação filogenética e epidemiológica dos HPV's anogenitais .....	22
TABELA 2: Funções dos genes do vírus do papiloma humano .....	26
TABELA 3: Prevalência dos tipos de HPV em câncer cervical invasivo nas diferentes regiões do Brasil .....	32
TABELA 4: Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do gene da globina e do HPV .....	57
TABELA 5: Conjunto de iniciadores utilizados para tipagem do HPV por PCR tipo-específica .....	61
TABELA 6: Genótipos identificados por caso .....	71
TABELA 7: Análise PCR tipo-específica x Sequenciamento .....	75
TABELA 8: Tipagem do HPV por PCR tipo-específica e por Sequenciamento nos casos de infecção simples .....	76
TABELA 9: Tipagem do HPV por PCR-tipo específica e por Sequenciamento nos casos de infecção múltipla .....	77
TABELA 10: Casos com resultado de tipagem diferente entre PCR tipo-específica e sequenciamento .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC – adenocarcinoma  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância e Saúde  
bDNA – *Branched-DNA*  
CCS – carcinoma de células escamosas  
ddH<sub>2</sub>O – água bidestilada  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DST – Doença sexualmente transmissível  
EUA – Estados Unidos da América  
FDA – *Federal Drug Administration*  
FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência  
GP – iniciador GP5+/GP6+  
HC2 – Captura híbrida de segunda geração  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
HPV – Vírus do papiloma humano  
HSIL – Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau  
ICTVdB – *The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses*  
INCA – Instituto Nacional do Câncer  
ISH – Hibridação molecular *in situ*  
LCR – Longa região de controle  
LSIL – Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau  
LSSP – iniciador único em baixa estringência  
MY – iniciador MY09/MY11  
NCBI – *National Center of Biotechnology Information*  
NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical  
NUPAD – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio e Diagnóstico  
p53 – proteína 53  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PCR/EIA – Reação de PCR imunoenzimática  
pRb – proteína do retinoblastoma



PV – Vírus do papiloma

RFLP – Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

UI – unidade internacional

VLP – Partícula semelhante a vírus

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 O vírus do papiloma humano .....	21
2.1.1 Classificação do HPV .....	21
2.1.2 Estrutura e organização do genoma viral .....	24
2.1.3 Infecção pelo HPV .....	26
2.1.3.1 História natural da infecção .....	26
2.1.3.2 Ciclo da infecção .....	28
2.1.4 Epidemiologia da infecção pelo HPV .....	31
2.1.5 HPV e câncer cervical .....	34
2.1.6 Vacinas anti-HPV .....	37
2.2 Métodos de detecção e tipagem do HPV .....	39
2.2.1 Citologia .....	39
2.2.2 Histopatologia .....	40
2.2.3 Imunoistoquímica .....	40
2.2.4 Sorologia .....	40
2.2.5 Biologia molecular .....	41
2.2.5.1 Detecção do HPV .....	43

2.2.5.1.1 Captura híbrida .....	43
2.2.5.1.2 Reação em cadeia da polimerase .....	44
2.2.5.2 Genotipagem do HPV .....	48
2.3 Aplicações clínicas da tipagem do HPV.....	50
2.3.1 Valor prognóstico .....	50
2.3.2 Desenvolvimento de estratégias de vacinas .....	51
2.3.3 Exame complementar .....	51
2.4 Justificativa do estudo .....	51
3 OBJETIVOS .....	53
3.1 Geral .....	53
3.2 Específicos .....	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
4.1 Considerações éticas .....	54
4.2 Casuística .....	54
4.2.1 Amostras .....	54
4.3 Metodologia .....	54
4.3.1 Coleta das amostras .....	54
4.3.2 Extração do DNA .....	55
4.3.3 Reação em cadeia da polimerase .....	56
4.3.3.1 Amplificação do gene da globina e detecção do HPV .....	56

4.3.3.2 Eletroforese em gel de agarose .....	60
4.3.3.3 Genotipagem por PCR tipo-específica .....	61
4.3.3.4 Genotipagem por sequenciamento .....	64
4.3.3.4.1 Análise das sequências .....	66
4.3.4 Análise estatística .....	67
5 RESULTADOS .....	68
5.1 Tipagem .....	69
5.1.1 PCR tipo-específica para os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35.....	72
5.1.2 Sequenciamento direto do produto amplificado .....	73
5.2 Comparação PCR tipo-específica e sequenciamento .....	75
6 DISCUSSÃO .....	79
6.1 Genotipagem do HPV .....	79
6.2 Comparação dos métodos PCR tipo-específica e sequenciamento .....	82
6.3 Avaliação da estratégia a ser empregada na prática clínica .....	85
7 CONCLUSÕES .....	88
REFERÊNCIAS .....	89
ANEXOS .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) é a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais frequente na população sexualmente ativa, uma vez que a maioria das pessoas é exposta ao vírus em algum momento de suas vidas (SAN JOSÉ et al, 2007).

Após mais de 20 anos de investigação sobre a associação entre HPV e carcinoma cervical de células escamosas, restam poucas dúvidas a respeito do papel central do vírus na sua gênese. Sabe-se hoje que aproximadamente 50% desses cânceres contêm HPV 16 e/ou 18 e mais de 95% estão associados a um ou mais tipos virais de alto risco (MUNOZ et al, 2003).

O exame colpocitológico é um método acessível e rápido que pode ser utilizado no rastreamento da infecção pelo HPV na população em geral, embora exista taxa apreciável de resultados falso-negativos; além disso, a grande variação de resultados intra e inter-observadores tornou necessário o uso de outros métodos diagnósticos mais seguros e precisos (CARESTIATO et al, 2006; CARMO, FIORINI, 2007).

O desenvolvimento de novos testes diagnósticos, entre os quais se inclui a tecnologia de ácidos nucléicos, trouxe grande contribuição ao diagnóstico de muitas doenças, incluindo a infecção pelo HPV. Atualmente, estão disponíveis diversos métodos moleculares, entre eles a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se destaca por sua alta sensibilidade. Com o emprego dessa técnica, sabe-se que a infecção pelo HPV pode ser muito mais comum, manifestando desde portadoras assintomáticas até pacientes com câncer cervical invasivo (SASAGUAWA et al, 2001).

Os exames moleculares podem identificar os diferentes tipos de HPV (de baixo e de alto risco oncogênico) em células obtidas de várias formas, incluindo a triagem citológica de rotina. Por apresentarem grande sensibilidade, têm sido foco de interesse de muitos estudiosos e dado enorme contribuição aos estudos epidemiológicos e clínicos.

Além do reconhecimento do HPV em uma amostra, é muito importante conhecer o tipo viral presente, uma vez que diferentes genótipos têm papel patogênico distinto na carcinogênese. Enquanto a detecção do vírus é razoavelmente fácil em uma amostra qualquer, o mesmo não se pode dizer sobre sua tipagem. Para isso, muitas estratégias têm sido testadas. No presente estudo, duas delas – PCR tipo-específica e sequenciamento – foram aplicadas com vistas a avaliar qual delas oferece maior eficácia.

---

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

#### 2.1.1 Classificação do HPV

Os vírus do papiloma (PV), que pertencem à família *papillomaviridae* e infectam muitas espécies de vertebrados, são altamente espécie-específicos e similares na estrutura física e organização do genoma (SASAGUAWA et al, 2001; STANLEY, 2001; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; de VILLIERS et al, 2004).

Os vírus do papiloma humano (HPV) são os vírus transmitidos sexualmente mais comuns em indivíduos jovens e sexualmente ativos de ambos os sexos (SAN JOSÉ et al, 2007). Os tipos de HPV variam quanto ao tropismo celular, associação às diferentes lesões e potencial oncogênico. De acordo com a homologia na sequência de DNA e a associação com as lesões clínicas, os HPVs podem ser agrupados inicialmente em tipos cutâneos e mucosos (GROSS, BARRASSO, 1999). Os HPVs anogenitais são classificados no gênero *Alphapapillomavirus* (CHAN et al, 1995; de VILLIERS et al, 2004), o qual é primariamente mucosotrópico, embora contenha alguns tipos cutâneos; os vírus desse grupo compartilham certas características comuns (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008). Os tipos mucosotrópicos infectam mucosas e são classificados em alto e baixo risco de acordo com sua relação com lesões proliferativas benignas ou malignas (MACMURRAY et al, 2001; OLIVEIRA, ROSA, CAVALCANTE, 2008; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005; STOLER, 2003). A Tabela 1 resume a classificação epidemiológica e filogenética dos HPVs anogenitais proposta por Munoz et al (2006).

**TABELA 1**  
**Classificação filogenética e epidemiológica dos HPVs anogenitais**

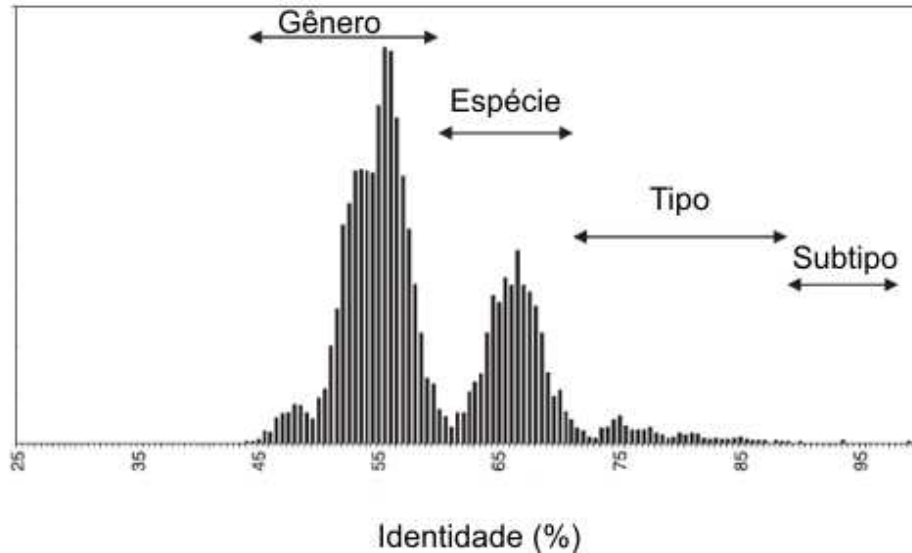
HPV Espécies (alpha)	HPV Genotipo	Risco	HPV Espécies (alpha)	HPV Genotipo	Risco	HPV Espécies (alpha)	HPV Genotipo	Risco
1	HPV32	Indeterminado	6	HPV30	Indeterminado	10	HPV6	Baixo
	HPV42	Baixo		HPV53	Provável alto		HPV11	Baixo
2	HPV28	Indeterminado	7	HPV56	Alto		HPV13	Baixo
	HPV3	Indeterminado		HPV66	Provável alto	HPV74	Indeterminado	
	HPV10	Indeterminado		HPV59	Alto	HPV44	Baixo	
	HPV29	Indeterminado			HPV18	Alto	HPV55	Indeterminado
	HPV77	Indeterminado			HPV45	Alto	11	HPV34
3	HPV61	Baixo	HPV70	Baixo	HPV73	Provável Alto		
	HPV72	Baixo	HPV39	Alto	13	HPV54	Baixo	
	HPV62	Indeterminado		HPV68				Provável Alto
	HPV81	Baixo	HPV85	Indeterminado	15	HPV71	Indeterminado	
	HPV83	Indeterminado	8	HPV91				Indeterminado
	HPV89	Baixo		HPV7				Indeterminado
	HPV84	Indeterminado		HPV40				Baixo
HPV86	Indeterminado	HPV43	Baixo					
HPV87	Indeterminado	9	HPV52	Alto	HPV90	Indeterminado		
4	HPV57		Indeterminado	HPV67			Indeterminado	
	HPV2a		Indeterminado	HPV33			Alto	
	HPV27		Indeterminado	HPV58			Alto	
5	HPV26		Provável alto	HPV16			Alto	HPV31
	HPV69	Indeterminado	HPV35	Alto				
	HPV51	Alto						
	HPV82	Provável alto						

Fonte: MUNOZ et al, 2006.

Com base no sequenciamento do genoma viral, foi possível estabelecer uma classificação baseada em componentes genômicos, usando a nomenclatura tradicional como tipo, subtipo e variante. Para isso, é utilizada a região mais conservada do genoma viral, a do gene L1; variações nesta sequência permitem a diferenciação dos tipos (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008). Segundo Bernard et al (1994), um genoma de HPV é considerado como representativo de um novo tipo quando as sequências dos genes E6, E7 e L1 (isto é, em torno de um terço do genoma) diferem em mais de 10% de qualquer tipo de HPV previamente conhecido. Além disso, as classificações taxonômicas para tipos, subtipos e variantes segundo a sequência nucleotídica do gene L1 baseia-se em diferenças de



pelo menos 10%, 2-10% e até 2%, respectivamente (FIG.1) (BERNARD et al, 1994; de VILLIERS et al, 2004).



**Figura 1: Classificação do HPV com base na homologia da sequência do DNA da região L1 em 118 genótipos. Fonte: de VILLIERS et al, 2004.**

No momento, são conhecidos mais de 230 tipos de HPV com base na sequência do DNA viral (HAWES et al, 2004); 118 genótipos estão bem caracterizados de acordo com o nicho biológico, potencial oncogênico e posição filogenética (de VILLIERS et al, 2004) (FIG.2). São reconhecidos cerca de 40 tipos de HPVs que infectam a região anogenital, sendo 15 deles – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 – considerados oncogênicos ou de alto risco, por estarem associados a lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) ou câncer. Os tipos 26, 53 e 66 são provavelmente carcinogênicos, enquanto os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e *cand*HPV89/Cp6108 são tidos como de baixo risco (MUNOZ et al, 2003).

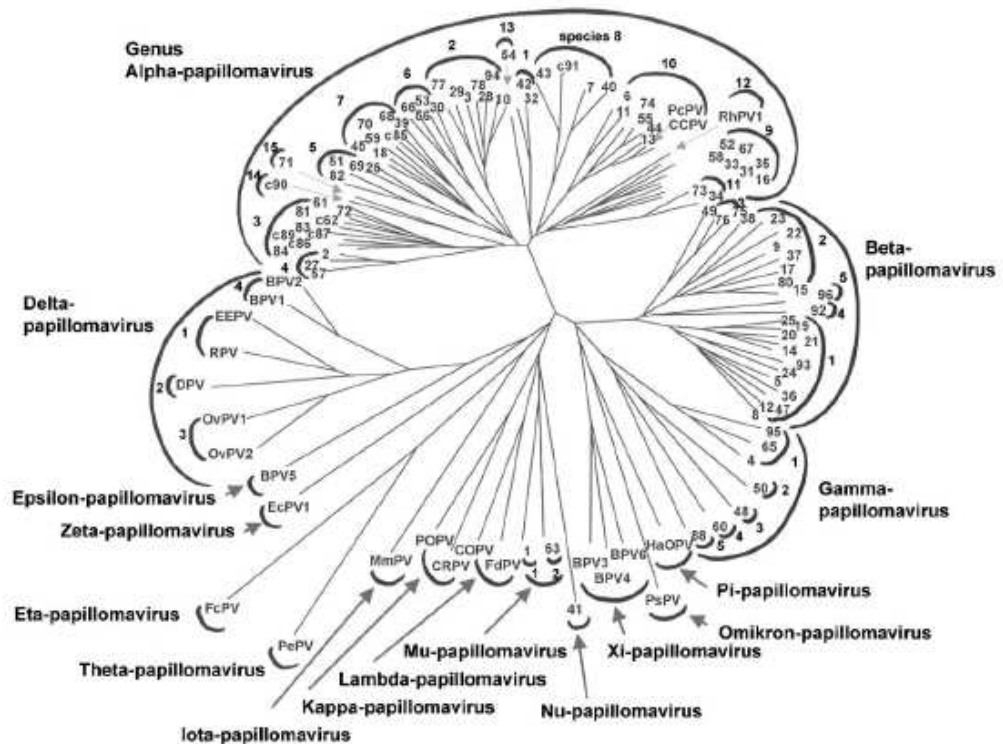


Figura 2: Árvore filogenética mostrando os tipos de PV identificados até 2004. Fonte: de VILLIERS et al, 2004.

### 2.1.2 Estrutura e organização do genoma viral

O HPV apresenta capsídeo icosaédrico não envelopado com diâmetro de 52 a 55nm. Devido à ausência de um envelope, o vírus é relativamente estável e resistente à dessecação, mantendo-se viável no meio extracelular por até uma semana (DOORBAR, 2005). O genoma de DNA circular de dupla fita, com cerca de 7.900 pares de base, tem organização simples, que pode ser dividida em duas regiões codificantes: a região precoce “E” (do inglês *early*) – proteínas não-estruturais, e a região tardia “L” (do inglês *later*) – proteínas estruturais, assim denominadas de acordo com o momento em que são expressas durante a infecção. O DNA viral possui ainda uma Longa Região de Controle “LCR” (do inglês *Long Control Region*) não-codificante (FIG. 3) (KANODIA et al, 2007; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORHYZ, 2005; STOLER et al, 2003; SZOSTEK et al, 2006). A região E codifica 7 ou 8 proteínas, as quais estão associadas à replicação do DNA viral, transcrição e transformação celular, executando as funções regulatórias vitais para a produção da progênie viral; a região L codifica duas

proteínas do capsídio responsáveis pela produção viral e empacotamento do DNA. As funções dessas proteínas estão resumidas na Tabela 2 (KANODIA et al, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

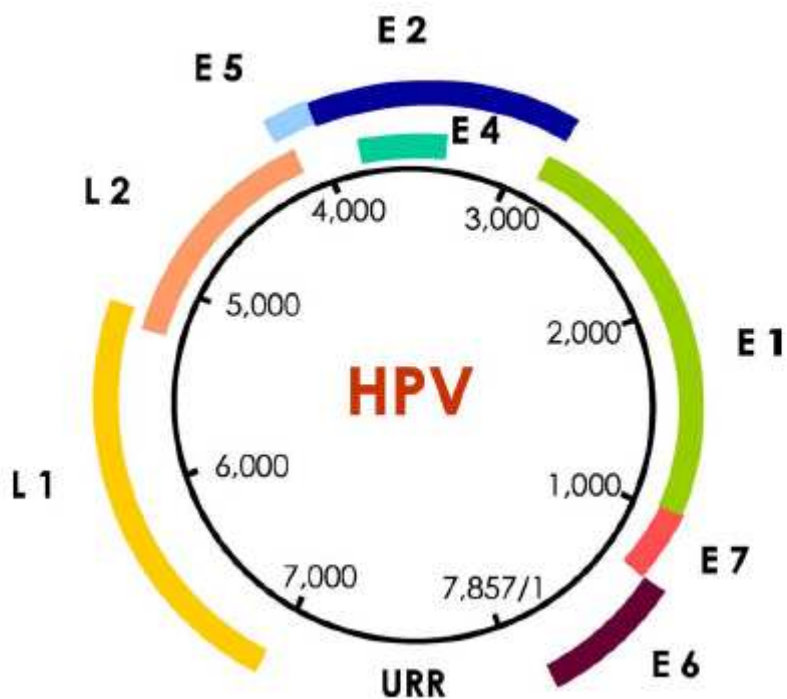


FIGURA 3: Representação esquemática do genoma do HPV. Fonte: MUNOZ et al, 2006.

**TABELA 2**  
**Funções dos genes do vírus do papiloma humano**

Gene	Função
E1	Atividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, atividade de ATPase.
E2	Papel na replicação e na repressão da replicação. Regulador da transcrição e replicação viral, controle da região de expressão precoce ( <i>Early</i> ), necessária para a replicação viral eficiente junto com E1.
E3	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus).
E4	Expresso primariamente em epitélios em diferenciação, associado ao citoesqueleto de ceratina de células epiteliais em cultura. Papel na liberação de vírus.
E5	Atividade de transformação do HPV16 <i>in vitro</i> . Possivelmente estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , e pode ter papel na iniciação da carcinogênese.
E6	Papel no processo de transformação junto com E7. Propriedades de ativação transcricional. E6 dos HPV's de alto risco inativa p53 pela degradação rápida através da via ubiquitina. Junto com E7 propicia o ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz síntese de DNA em células em repouso. E7 se liga à forma hipo-fosforilada da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação funcional, permitindo a progressão para a fase S do ciclo celular. Proteína E7 dos tipos de baixo risco (6 e 11) liga-se menos eficientemente do que a proteína E7 dos tipos de alto risco (16 e 18).
E8	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus).
L1	Proteína principal do capsídio (expressão tardia, <i>Late</i> ).
L2	Proteína menor do capsídio.

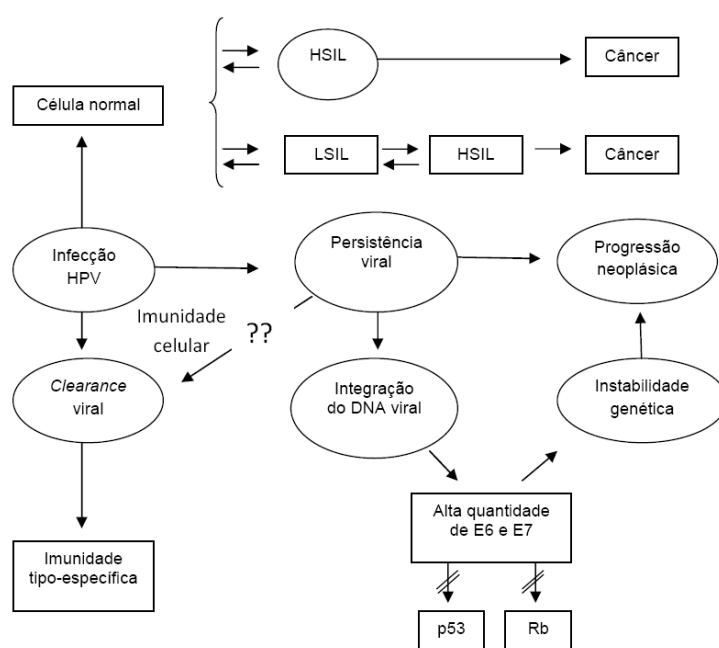
**Fonte: SANCLEMENTE, GILL, 2002**

### 2.1.3 Infecção pelo HPV

#### 2.1.3.1 Historia natural da infecção

Estudos de coorte têm delineado a história natural da infecção genital pelo HPV em mulheres e mostrado claramente que existem mecanismos de defesa do hospedeiro contra o vírus. O aumento da incidência e progressão da infecção pelo HPV em indivíduos imunossuprimidos mostram o papel crítico da resposta imunitária na resolução e controle da infecção (STANLEY, 2001). É fato bem documentado que mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm alta prevalência de infecção pelo HPV e lesões intra-epiteliais escamosas. Neste grupo de pacientes imunossuprimidas, as lesões são mais agressivas e sua progressão é mais rápida do que nas imunocompetentes; além disso, as lesões são de difícil tratamento e têm alta taxa de recorrência (CLIFFORD et al, 2006a; ELLERBROCK et al, 2000; LEVI et al, 2004).

As infecções transitórias pelo HPV são bastante comuns em mulheres jovens sexualmente ativas. A maioria dessas infecções é sub-clínica e cura-se espontaneamente; apenas uma minoria desenvolve infecção persistente. Quando infectadas por HPVs de alto risco, as lesões evoluem para lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e, algumas delas, progridem para carcinoma invasor (STANLEY, 2001). A Figura 4 mostra de forma esquemática alguns dos principais componentes da evolução da infecção pelo HPV para o câncer (BOSCH et al, 2002).



**Figura 4: Mecanismos da carcinogênese pelo HPV. Fonte: BOSCH et al, 2002, modificado.**

Vários estudos demonstram a forte associação entre a progressão neoplásica relacionada ao HPV e o estado imunitário. Os mecanismos exatos que disparam a resposta imunitária eficiente contra as lesões provocadas pelo HPV, no entanto, não são ainda totalmente conhecidos (PINTO, TULIO, CRUZ, 2002). A participação do sistema imunitário é fator crucial na evolução da infecção pelo HPV, pois pode eliminar o vírus ou permitir sua persistência no hospedeiro. O que já está bem estabelecido por estudos de coorte prospectivos é que as lesões pré-cancerosas

(neoplasias intra-epiteliais cervicais) podem regredir, persistir ou progredir para carcinoma *in situ* ou invasor (BRENNAN, SYRJANEN, 2003).

As lesões genitais causadas pelo HPV podem ser condilomas ou neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) de diferentes graus. NIC I, também conhecida como displasia leve, é considerada lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL); NIC II e NIC III, em displasias moderada e acentuada, respectivamente, estão agrupadas na categoria lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL) (KANODIA et al, 2007).

### **2.1.3.2 Ciclo da infecção**

O ciclo de replicação viral é a chave para se entender a patogênese e a imunobiologia desse vírus. O conhecimento do processo ainda é limitado em alguns pontos, devido principalmente à inabilidade de se cultivar células infectadas, por longo período de tempo, com o vírus e de se obter o ciclo completo da infecção *in vitro*. Assim, muitas das informações sobre o ciclo da infecção foram obtidas a partir da infecção natural em animais, principalmente coelhos, cães e roedores (STANLEY, 2001).

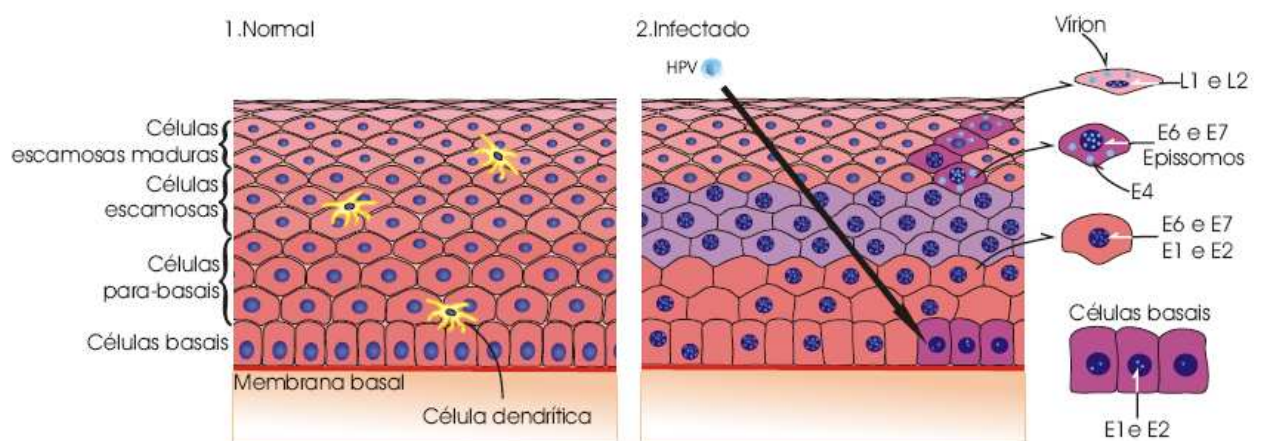
O ciclo de vida do HPV depende da diferenciação das células epiteliais. Acredita-se que a infecção pelo vírus inicia-se nas células basais ou parabasais do epitélio cervical metaplásico. À medida que se dividem, as células basais e parabasais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas. Ao se dividirem, as células infectadas pelo HPV distribuem equitativamente o DNA viral entre as duas células filhas. Uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece indiferenciada na camada basal, servindo como reservatório do DNA viral. Para que os vírus infectem as células da camada basal é necessário que ocorra perda da integridade do epitélio, como é o caso de microerosões ou traumatismos na pele ou mucosas (DOORBAR, 2005).

O padrão de expressão gênica nas células basais infectadas pelo HPV ainda não é bem conhecido, acreditando-se que as proteínas E1 e E2 sejam expressas para manter o DNA viral na forma episossomal e para facilitar a correta segregação do

genoma viral durante a divisão celular. Ainda não se sabe se as proteínas E6 e E7 são expressas, no ciclo produtivo, nas células da camada basal; admite-se que a expressão de E1 e talvez de E2 seja suficiente para a manutenção basal dos epissomos virais (CARMO, FIORINI, 2007; DOORBAR, 2005; KANODIA et al, 2007; MACMURREY et al, 2001; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005).

Para a produção de vírions infectantes, os vírus devem replicar seu genoma e empacotá-lo em partículas. Isto ocorre nas células das camadas média ou superficial do epitélio, após aumento na atividade do promotor tardio. A replicação ocorre em células em proliferação e requer a expressão de E4 e E5, cujas funções na replicação não estão bem definidas. A ligação de E2 à região regulatória do DNA viral é necessária para que ocorra a replicação viral e recrutamento da proteína E1, que atua como uma helicase, na origem da replicação. Dessa forma, ocorre a replicação do DNA viral nas camadas basais e parabasais, seguida da montagem do capsídeo viral nas camadas mais superiores do epitélio (DOORBAR, 2005).

Para a síntese viral ser finalizada, o vírus do papiloma humano codifica as duas proteínas estruturais, L1 e L2, as quais são expressas nas camadas superiores do epitélio. Desse modo, são formadas partículas virais que são liberadas somente quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio, uma vez que o HPV não possui ciclo lítico (DOORBAR, 2005). A Figura 5 ilustra os principais estágios do ciclo celular do HPV.



**FIGURA 5: Etapas do ciclo celular do HPV. Fonte: MUNOZ et al, 2006; modificado.**

Se a infecção persiste, distúrbios no controle da replicação dos HPVs de alto risco podem levar à integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, causando transformação celular. A integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro leva à sua linearização entre os genes E1 e L1 e a inativação do gene E2, por corte ou deleção no momento da integração. O gene E2 codifica uma proteína responsável pela regulação da expressão dos genes E6 e E7; sua perda induz a expressão “descontrolada” dos genes E6 e E7, acelerando o processo de transformação e de imortalização celular, resultando nas alterações fenotípicas nas células (KANODIA et al, 2007; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005; STOLER et al, 2003).

Os genes virais E6 e E7 codificam proteínas com o mesmo nome responsáveis pelo potencial oncogênico do vírus. As proteínas E6 e E7 dos principais tipos de HPVs oncogênicos formam complexos com as proteínas celulares p53 e pRb (respectivamente), inativando a sua função como controladoras do ciclo celular. A inativação dessas proteínas celulares (p53 e pRb) pelas proteínas virais causa transtornos no crescimento celular e impede os processos de reparação do DNA, promovendo instabilidade genética, acúmulo de mutações e, em última instância, o desenvolvimento de neoplasias. Este mecanismo tem sido várias vezes descrito como crucial para a transformação e proliferação celulares (CARMO, FIORINI, 2007; KIM, SONG, HWANG, 2001; SCHEURER, TORTOLERO-LUNA, ADLER-STORTHZ, 2005; STOLER et al, 2003; SZOSTEK et al, 2006).

Na maioria dos cânceres cervicais, o DNA do HPV 18 encontra-se integrado ao genoma celular; cerca de 30% dos cânceres cervicais contendo HPV 16 não mostraram evidências de integração, enquanto os tipos 33 e 52 parecem ser menos propensos à integração do que o HPV 16. A integração do genoma do HPV não é condição indispensável para o desenvolvimento do câncer (GROSS, BARRASSO, 1999).



#### 2.1.4 Epidemiologia da infecção pelo HPV

O HPV apresenta dois picos de prevalência: um mais elevado em mulheres jovens, com queda gradual com a idade, e outro entre a quarta e a quinta décadas. Acredita-se que o segundo pico reflete a perda da imunidade original contra o vírus ao qual estas mulheres estiveram expostas em idade mais jovem. A grande maioria das infecções cede espontaneamente, a ponto de não serem detectadas. A maior preocupação é com as infecções persistentes causadas pelos HPVs oncogênicos, pelo aumento do risco de desenvolver neoplasias (NADAL, MANZIONE, 2006).

A prevalência do HPV depende da região geográfica, sendo o tipo 16 o mais prevalente nos carcinomas cervicais em todo o mundo, seguido pelo tipo 18; esses dois tipos contribuem com mais de 50% das infecções detectadas em HSIL, 70% das infecções em câncer invasivo e 81,5% das infecções em adenocarcinomas. Tais observações são condizentes com estudos prospectivos que mostram que os HPVs 16 e 18 possuem vantagem para a persistência e progressão para lesão cervical quando comparados com outros tipos de alto risco (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

Estudo de meta-análise compreendendo 85 estudos publicados até 2002 mostrou que a distribuição dos tipos de HPV varia significativamente entre carcinoma de células escamosas (CCS) e adenocarcinomas (ADC), sendo que o HPV 16 foi identificado com maior frequência em CCS do que em ADC e o HPV 18 em ADC do que em CCS (CLIFFORD et al, 2006b).

Os tipos 45, 31 e 33 são os próximos em termos de prevalência nos casos de câncer, embora a ordem varie entre diferentes regiões (MEIJER, SNIJDERS, CASTLE, 2006). Nas Américas do Sul e Central, os tipos mais prevalentes são 16, 18, 45, 31 e 33 (SILVA et al, 2006). Em outras áreas, como na Ásia, os tipos 52 e 58 são os mais prevalentes após o 16 e 18 (MEIJER, SNIJDERS, CASTLE, 2006).

Os tipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 e 35 estão presentes em 95% dos CCS, achado este que tem importante implicação para a prevenção do câncer cervical, uma vez que uma vacina efetiva contra os cinco tipos mais comuns poderia evitar

cerca de 90% dos casos de câncer cervical em todo o mundo. Contudo, variações regionais na distribuição dos tipos devem ser levadas em conta para o desenvolvimento de vacinas (MUNOZ et al, 2003).

Em estudos recentes de meta-análise, cujo objetivo foi estimar a prevalência mundial do DNA do HPV em mulheres com exame citológico normal, os cinco tipos mais comuns encontrados foram o 16, 18, 31, 58 e 52, sendo que os tipos 16 e 18 ou ambos responderam por um terço das infecções. A África foi a região de maior prevalência, o que pode ser atribuído em parte à falta de condições de acesso à saúde e co-infecção com o HIV (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

No Brasil, estudos de prevalência dos HPVs presentes no câncer cervical mostram que o HPV 16 é o mais prevalente, embora com variações regionais em relação aos outros tipos (TAB.3) (RABELO-SANTOS et al, 2003).

**TABELA 3**  
**Prevalência dos tipos de HPV em câncer cervical invasivo nas diferentes regiões do Brasil.**

Central <sup>a</sup> n=56		Sul <sup>b</sup> n=46		Sudeste <sup>c</sup> n=186		Norte <sup>d</sup> n=147		Nordeste <sup>e</sup> n=59	
Tipo	%	Tipo	%	Tipo	%	Tipo	%	Tipo	%
16	57.1	16	52.2	16	53.8	16	43.5	16	59.3
33	8.9	18	8.7	18	8.6	18	8.2	31	11.9
18	5.4	31	4.3	31/33	3.2	Pool	13.6	18	5.1
31	1.8	45	4.3					33	5.1
Não tipado	7.1	Não tipado	17.4	Não tipado	18.8	Não tipado	6.8	Não tipado	8.5
Outros tipos	7.9	Outros tipos	8.7	Outros tipos	84.4	Outros tipos	70.3	Outros tipos	89.8
Negativo	21	Negativo	13	Negativo	15.6	Negativo	29.7	Negativo	10.2

a:Rabelo-Santos et al, 2003; b: Bosch et al, 1995; c: Eluf-Neto et al, 1994; d: Noronha et al, 1999; e: Lorenzato et al, 2000

**Fonte:RABELO-SANTOS et al, 2003**

A introdução de testes mais sensíveis para detecção do DNA do HPV revelou a existência de infecções por múltiplos tipos, principalmente em mulheres com exame citológico anormal. Nesses casos, pode haver confusão na identificação de qual ou quais tipos de HPV está contribuindo para o desenvolvimento da lesão (SASAGAWA et al, 2001).

A infecção pelo HPV é encontrada em cerca de 20% a 30% das mulheres em geral (MENDEZ et al, 2005), em mais de 35% daquelas com anormalidades citológicas avançadas (MOLIJN et al, 2005) e em mais de 50% das infectadas pelo HIV (LEVI et al, 2002; MOLIJN et al, 2005); no entanto, genótipos múltiplos são menos prevalentes em pacientes com carcinomas (MOLIJN et al, 2005; SASAGAWA et al, 2001).

A prevalência do DNA do HPV parece depender bastante do método diagnóstico utilizado, das lesões específicas (de VILLIERS, 1997; TONG et al, 2007) e das características demográficas e biocomportamentais da população em estudo (PEYTON et al, 2001); a prevalência é maior quando se utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) do que outros testes (de RODA HUSMAN et al, 1995).

Estudos epidemiológicos sugerem que a resposta imunitária ao HPV é específica, mas ainda não foi estabelecida nenhuma concordância em relação à infecção com múltiplos tipos no processo da carcinogênese cervical (OLIVEIRA, ROSA, CAVALCANTE, 2008). Embora infecção por múltiplos tipos de HPV tenha sido achada frequentemente em mulheres brasileiras infectadas pelo HIV, infecção concomitante com três ou mais tipos não conferiu risco adicional à displasia cervical em relação à infecção simples (LEVI et al, 2004). Em outro estudo foi sugerido que a combinação dos genótipos de HPV pertencentes a diferentes espécies pode ser um indicador prognóstico de neoplasia cervical, uma vez que a combinação de tipos de alto risco das espécies A7 e A9 (TAB. 1) aumentou o risco de HSIL e câncer (OLIVEIRA, ROSA, CAVALCANTE, 2008).

Estudos de caso-controle indicam que fatores hormonais, alta paridade, uso prolongado de contraceptivos orais, infecções por *Chlamydia trachomatis*, vírus Herpes Simples II e HIV podem ser considerados co-fatores para infecção do HPV; outros possíveis co-fatores incluem deficiência nutricional, fatores do hospedeiro que aumentam a suscetibilidade para infecção, tais como fatores genéticos e moduladores da resposta imunitária ao HPV (MUNOZ, 2000; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

### **2.1.5 HPV e câncer cervical**

O HPV está associado a muitas lesões, sendo a mais comum o condiloma acuminado, e a diferentes tipos de câncer, incluindo cervical, vaginal, vulvar, peniano, anal, de orofaringe, cavidade bucal e laringe (BOSCH et al, 2002; KANODIA et al, 2007; MONTALDO et al, 2007); mais recentemente, alguns estudos sugerem que o HPV pode estar relacionado também ao câncer colo-retal (DAMIN et al, 2007).

Embora não seja e nem se transforme em neoplasia, o condiloma acuminado causa, por vezes, altos custos para tratamento, seqüelas locais (por conta de cirurgias e cauterizações) e trauma emocional, entre outros. Tudo isso é agravado porque em muitos casos a recidiva é frequente, de modo que a paciente com verruga genital tem de voltar várias vezes ao médico (PASSOS, 2008).

Dentre os tipos de câncer associados ao HPV, o do colo uterino assume importância particular, sendo considerado um sério problema de saúde pública, devido a sua elevada incidência e alta taxa de mortalidade. Na maioria dos casos, o tumor tem evolução lenta e sua prevenção consiste em identificar o mais precocemente possível as lesões precursoras no epitélio cervical, permitindo o tratamento eficaz antes do aparecimento de invasão local e disseminação da doença (BEZERRA et al, 2005). A gênese e o desenvolvimento do câncer cervical são processos que se realizam em múltiplas etapas, nas quais o HPV é o agente etiológico mais importante (MUNOZ et al, 2003, 2000; WALBOOMERS et al, 1999).

O carcinoma cervical é o segundo câncer mais comum em mulheres em todo o mundo (BERTELSEN et al, 2006; FREITAS et al, 2007; KANODIA et al, 2007; MUNOZ et al, 2003; SASAGAWA et al, 2000), o terceiro mais frequente em mulheres nos Estados Unidos e o principal câncer em mulheres nos países em desenvolvimento (HAWS et al, 2004); estatísticas atuais mostram que 80% dos casos novos ocorrem nestes países (MUNOZ et al, 2003).

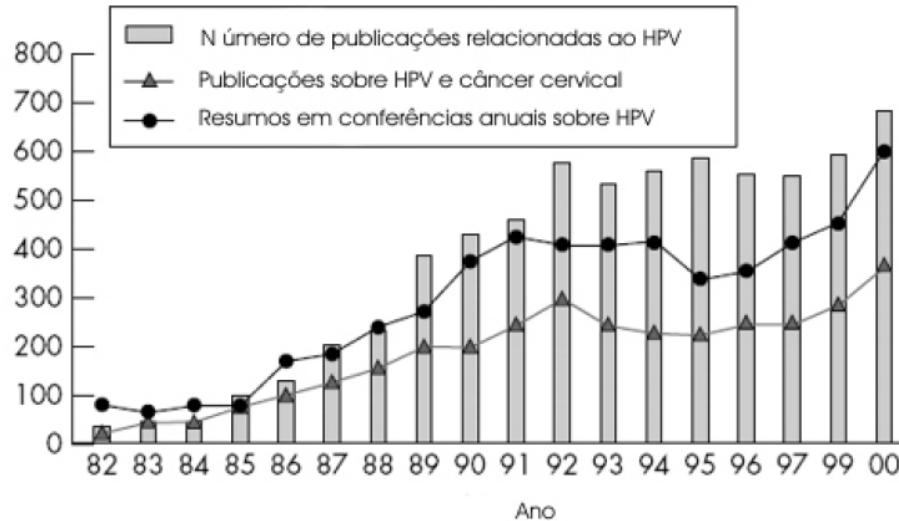
Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados no Brasil 18.680 novos casos de câncer do colo do útero no ano de 2008, com risco

estimado de 19 casos para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores da pele não-melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (22/100.000). Nas regiões Sul (24/100.000), Centro-Oeste (19/100.000) e Nordeste (18/100.000), esse câncer é o segundo mais frequente; no Sudeste (18/100.000), ocupa a quarta posição. Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo todo, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum no gênero feminino, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos, se comparada à dos mais desenvolvidos. A neoplasia é diagnosticada após os 20 anos de idade e sua incidência aumenta, rapidamente, até atingir seu pico, na faixa etária entre 45 e 49 anos.

Pesquisas relacionadas à etiologia do câncer cervical tiveram progressos importantes, principalmente nos últimos 20 anos, tanto em termos científicos como operacionais. Durante décadas o perfil epidemiológico de mulheres com câncer cervical sugeria uma doença sexualmente transmissível, tendo muitos agentes infecciosos sido propostos por vários autores, incluindo sífilis, blenorragia e o vírus Herpes simples tipo II (BOSCH et al, 2002).

O interesse pelo vírus do papiloma humano cresceu bastante, sobretudo depois que zur Hausen, na década de 1970, sugeriu a associação entre o vírus e o câncer cervical (zur HAUSEN, 1976, 1989). A partir daí, seguiram-se muitos outros estudos buscando confirmar esta relação (BOSCH et al, 2002; MUNOZ, 2000; WALBOOMERS et al, 1999; WRIGHT; RICHART et al, 1990) e explicar os mecanismos patogênicos envolvidos.

Somente na década de 1980, no entanto, com o desenvolvimento de tecnologias mais sensíveis que pudessem demonstrar a presença do DNA do HPV em amostras celulares, juntamente com colaborações multidisciplinares no campo científico, é que se tornou possível estabelecer e definir o papel etiológico do vírus no câncer cervical. Nesse sentido, inúmeras pesquisas foram e vêm sendo realizadas no mundo todo. A Figura 6 mostra o número aproximado de publicações no *Medline* relacionadas ao HPV e HPV e câncer cervical (BOSCH et al, 2002).

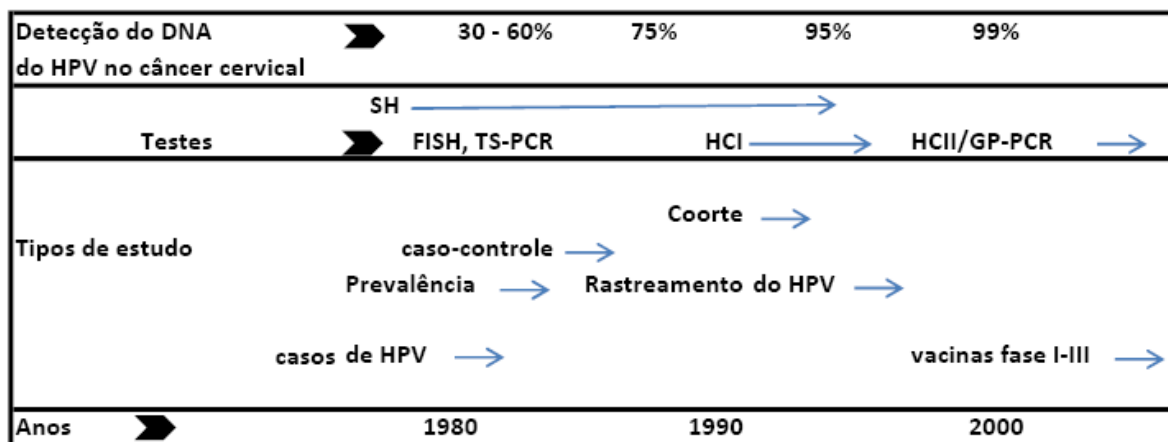


**Figura 6: Número de publicações referentes ao HPV e o câncer cervical nas últimas décadas. Fonte: BOSCH et al, 2002.**

Apesar de o INCA reconhecer o teste Papanicolau como muito efetivo no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo, a incidência da doença mantém-se como uma das mais altas entre as neoplasias malignas que acometem as mulheres brasileiras (BEZERRA et al, 2005).

O carcinoma cervical invasor é um dos cânceres que pode ser quase totalmente evitado por meio de programas de tratamento e prevenção, razão pela qual a implementação de ações de forma organizada e eficaz e a melhoria de estratégias e tecnologias para diagnóstico poderão diminuir a incidência da doença (DEPUYDT et al, 2007).

Muitos estudos mostraram associação do HPV com o câncer cervical (BOSCH et al, 1995, 2002; MUNOZ et al, 2006, 2000). DNA do HPV tem sido detectado em 95% a 99% dos casos de câncer cervical (FIG. 7) (BERTELSEN et al, 2006; BOSCH et al, 2002; SILVA et al, 2006; WALBOOMERS et al, 1999) e em cerca de 5% a 20% na população controle (BOSCH et al, 2002; MUNOZ et al, 2006; NAMKOONG, 1995; SAN JOSÉ et al, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).



**Figura 7: Evolução das pesquisas epidemiológicas sobre associação do HPV com o câncer cervical. SH = Hibridação por Southern blot, FISH = Hibridação *in situ* por fluorescência, TS-PCR = PCR tipo-específica, HCI-II = Captura híbrida primeira e segunda geração, GP-PCR = PCR com iniciadores genéricos. Fonte: BOSCH et al, 2002. Modificado.**

Embora existam fatores de risco adicionais para o desenvolvimento do câncer cervical, tais como imunossupressão, co-infecção com o HIV, tabagismo e uso de contraceptivos orais, a persistência da infecção por HPVs de alto risco é considerada o elemento mais importante no desenvolvimento dessa neoplasia (KANODIA et al, 2007; LEVI et al, 2002; NOBBENHUIS et al, 1999; PINTO, TULIO, CRUZ, 2002).

### 2.1.6 Vacinas anti-HPV

Uma possível alternativa para controlar a incidência da doença poderia ser a prevenção da infecção, o que teoricamente poderia ser alcançado através de programas de vacinação. Na década de 1990, iniciaram-se os testes clínicos com várias vacinas que tinham como alvo os tipos virais mais comuns (NADAL, MANZIONE, 2006). Atualmente, estão em estudo duas abordagens para produção de vacinas, uma profilática, para prevenir a infecção, e uma terapêutica, destinada ao tratamento dos indivíduos com doença invasiva (MACMURRAY et al, 2001; NADAL, MANZIONE, 2006; PEREIRA et al, 2007). Entre outros fatores, a grande

variedade de genótipos constitui grande desafio para o desenvolvimento de vacinas efetivas.

A Agência Nacional de Vigilância e Saúde (ANVISA) do Brasil aprovou o uso da primeira vacina anti-HPV em agosto de 2006, uma vacina quadrivalente produzida pelo Laboratório Merck Sharp & Dohme, a qual protege contra os tipos 6, 11, 16 e 18 em um regime de três doses (PEREIRA et al, 2007; THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008). Esta vacina é elaborada a partir do capsídio viral vazio produzido por tecnologia do DNA recombinante, as chamadas partículas semelhantes a vírus (VLP's), que não contêm DNA ou produtos biológicos, sendo, por isso, não infectantes (NADAL L, NADAL S, 2008). Estudos recentes com o uso dessa vacina mostraram boa eficácia em prevenir a doença associada com os tipos virais nela incluídos. Um estudo de meta-análise encontrou eficácia de aproximadamente 98% em prevenir os tipos 16/18 relacionados com NIC II/III (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008); outro estudo mostrou notável redução de 90% na incidência da infecção do HPV para os tipos 16 e 18. Dados preliminares sugerem que a vacina bivalente HPV 16 e HPV 18 pode também proteger contra os tipos relacionados ao HPV 16 (31, 33, 35, 52 e 58) e ao HPV 18 (39, 45, 59, 68 e 85) (ORTIZ et al, 2006).

Em relação à vacina terapêutica, ainda não há nenhuma licenciada para uso em humanos, pois não foram encontradas evidências de que as proteínas virais podem exercer efeito regressor. Estudos com VLP's combinadas com as proteínas E7/L1 demonstraram algum efeito terapêutico em modelos animais, mas em humanos têm mostrado pouca eficácia; algumas mulheres com NIC tiveram regressão da lesão, o que não foi observado em pacientes com câncer (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008).

De qualquer modo, ainda é muito prematuro associar esta vacina à prevenção do câncer do colo uterino no estágio em que se encontra (DERCHAIN, SARIAN, 2007; MURTA, 2007).



## **2.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV**

Há vários métodos para rastreamento do câncer cervical e da infecção pelo HPV. Na prática clínica, são empregados exames citológicos, colposcopia e biópsia cervical. Infecção subclínica pode ser detectada pela colposcopia. Contudo, esses métodos apenas sugerem a existência de infecção pelo HPV, correspondente ao seu efeito citopático (NAMKOONG, 1995). Neste contexto, os testes moleculares passaram a ser uma ferramenta chave para confirmação da infecção pelo HPV.

### **2.2.1 Citologia**

A triagem feita pela colpocitologia tem sido o meio mais utilizado para se detectar as lesões pré-cancerosas do colo uterino. Após ter sido usada pela primeira vez em 1943 por Papanicolau e Traut, a triagem citológica muito tem contribuído para a detecção precoce do câncer cervical (LEE et al, 2005).

O exame de Papanicolau consiste no estudo das células descamadas esfoliadas da ectocérvice e endocérvice do colo uterino, sendo atualmente o meio mais utilizado na rede de atenção básica à saúde por ser indolor, de baixo custo e eficaz, podendo ser realizado em qualquer localidade por um profissional treinado. No Brasil, o exame é oferecido gratuitamente pelos municípios, pelo Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero (BEZERRA et al, 2005). Este exame é o método de escolha desde a década de 1950, o que tem sido muito valioso para triagem em massa, por ser capaz de detectar lesões e orientar o tratamento adequado. Contudo, o teste tem sensibilidade limitada, sendo relatada taxa geral de resultado falso-negativo de 20% a 30% (CARESTIATO et al, 2006; CARMO, FIORINI, 2007) e, em lesões pré-malignas e malignas, de 15% a 50%. O exame fornece resultado falso-positivo em cerca de 30% (JACOBS et al, 1999). Assim, métodos complementares foram sendo estabelecidos ao longo dos anos, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce da doença cervical.

### **2.2.2 Histopatologia**

O diagnóstico histopatológico da infecção pelo HPV é de suma importância, pois nele se baseia a maioria das decisões terapêuticas até o momento. Além de auxiliar no diagnóstico da infecção pelo HPV, a histopatologia é capaz de graduar as lesões de acordo com seu potencial proliferativo (SOUZA, MELO, CASTRO, 2001).

### **2.2.3 Imunoistoquímica**

Pela imunoistoquímica pode-se detectar proteínas virais do HPV, que se encontram nas lesões observadas na microscopia óptica, em material incluído em parafina ou em preparados citológicos. Na prática, utilizam-se anticorpos policlonais contra antígenos específicos aos vários tipos de HPV (CARVALHO, OYAKAWA, 2000).

A imunoistoquímica para a região L1 do vírus tem alta especificidade, porém somente detecta as fases epissomais encontradas nas lesões de baixo grau, como condilomas e papilomas. Quando ocorre a integração do genoma viral à célula hospedeira, que pode ocorrer nos casos de lesões intra-epiteliais de alto grau, carcinomas epidermóides invasores e adenocarcinomas, a sensibilidade diminui, podendo haver resultados falso-negativos. Por essas razões, a imunoistoquímica não é um bom método para o diagnóstico da infecção pelo HPV, devido a sua baixa sensibilidade (CARVALHO, OYAKAWA, 2000).

### **2.2.4 Sorologia**

De um lado, há os estudiosos que preconizam que os testes sorológicos apresentam precisão limitada. Como a infecção é seguida de resposta imunitária humoral contra proteínas do capsídeo do vírus, os anticorpos permanecem detectáveis por muitos anos, não sendo capazes de distinguir infecções passadas de presentes (MOYA et al, 2006; SZOSTEK et al, 2006). De outro, alguns estudos têm mostrado que o diagnóstico sorológico da infecção através de VLP's correlacionam bem com a presença do DNA do HPV em amostras cervicais. Dessa forma, a sorologia com base nas VLP's tem sido usada como um marcador de

exposição cumulativa ao HPV e de comportamento sexual. Estudos de soroprevalência do HPV têm dosado anticorpos contra um único tipo, principalmente VLP's do HPV 16; outros têm testado o soro de mulheres saudáveis e de pacientes com câncer para anticorpos contra VLP's de vários tipos oncogênicos, nos quais foram observadas reações cruzadas entre alguns tipos, como 16 e 31. A reprodutibilidade e a padronização desses testes ainda não estão bem estabelecidas (IFTNER, VILLA, 2003).

### **2.2.5 Biologia Molecular**

A forte associação entre HPV e câncer cervical levou ao desenvolvimento de sistemas de detecção moleculares, que têm grande potencial de utilização neste campo. Hoje, a idéia de que estes testes podem ter papel importante na triagem do câncer cervical começou a se tornar universal. Muitas aplicações têm sido propostas, como triagem de mulheres com resultados citológicos duvidosos, seguimento para avaliação do tratamento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e triagem para os tipos oncogênicos juntamente com o exame citológico (DEPUYDT et al, 2007; LEE et al, 2005).

O diagnóstico da infecção pelo HPV baseado em testes moleculares começou a ser utilizado, principalmente, na década de 1980, quando as técnicas que utilizam sondas de ácidos nucléicos começaram a estar comercialmente disponíveis (HUBBARD, 2003).

Como a detecção direta do HPV em células cervicais tornou-se o foco de grande atenção e interesse para uso na triagem primária do câncer cervical, em 2003 a *Federal Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) aprovou o uso de testes moleculares para detecção do HPV em mulheres com idade superior a 30 anos em combinação com o exame de Papanicolau, uma vez que a infecção que ocorre em mulheres mais jovens, muito prevalente, tende a curar-se espontaneamente (THOMISSON, THOMAS, SHROYER, 2008; TONG et al, 2007).

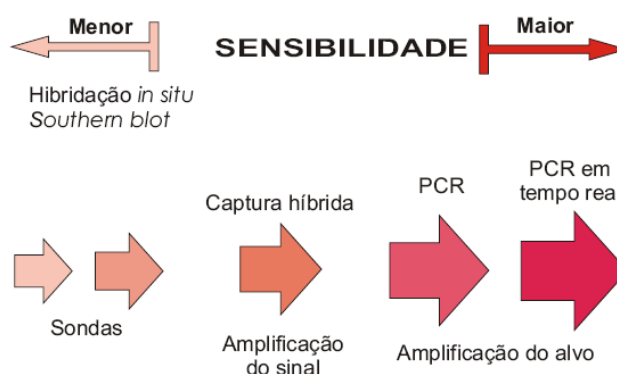
Nos países da Europa e nos EUA existem protocolos estabelecidos para inclusão de testes para o DNA do HPV em programas de rastreamento do câncer

cervical. Em comparação com o exame citológico, o teste molecular é altamente reprodutível e pode ser mais facilmente monitorado e automatizado (COX, CUZICK, 2006).

Utilizando técnicas de biologia molecular, estudos de coorte demonstraram que a associação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de NIC é forte, sendo consistente com resultados reproduzidos em diferentes populações de que a infecção precede o início das lesões intra-epiteliais (SILVA et al, 2006; SMITH et al, 1992). Com esses recursos, foi possível também realizar estudos retrospectivos a partir de amostras de arquivo armazenadas em blocos de parafina, contribuindo para os estudos epidemiológicos e para melhor entendimento da relação do HPV com o câncer cervical (BERTELSEN et al, 2006; HUANG et al, 2003; SMITH et al, 1992).

Cada técnica molecular empregada ao longo dos anos tem apresentado vantagens e desvantagens. Ainda não existe um teste que possa ser considerado como perfeito para o exame diagnóstico, mas à medida que esta metodologia se torna bem estabelecida e suas limitações conhecidas, ela pode ser uma ferramenta importante (de VILLIERS, 1997).

Os testes moleculares podem ser classificados essencialmente em três tipos (FIG. 8): 1) hibridação molecular com sondas de ácidos nucleicos (ex: *Southern blot*, *dot blot*, hibridação *in situ* [ISH], hibridação *in situ* com fluorescência [FISH]), que foram as primeiras técnicas utilizadas; sua sensibilidade é variada e levam tempo de trabalho razoável; 2) amplificação de sinal (ex: teste de captura híbrida [HC2, bDNA]), que são excelentes ferramentas para triagem em massa de pacientes com anormalidades citológicas, embora não determinem o tipo viral presente; 3) reação de amplificação (ex: PCR), técnica promissora que permite a multiplicação *in vitro* de regiões específicas do DNA e pode ser usada para detecção, genotipagem, quantificação da carga viral e sequenciamento (HUBBARD, 2003; MOLIJN et al, 2005).



**Figura 8: Testes moleculares e grau de sensibilidade. Fonte: HUBBARD et al, 2003. Modificado.**

### 2.2.5.1 Detecção do HPV

Atualmente, as duas principais abordagens usadas para detecção molecular do HPV são: 1) PCR com iniciadores comuns que amplificam parte do gene L1 do capsídeo viral, o qual é altamente conservado entre os HPVs anogenitais; 2) teste de captura híbrida (HC2), que detecta os principais tipos de HPVs, de alto e baixo risco, mediante a formação de híbridos DNA-RNA; o método não distingue os tipos virais (CARESTIATO et al, 2006; CLIFFORD et al, 2006b; GIOVANELLI et al, 2004; IFTNER, VILLA, 2003; JACOBS et al, 1999; LEE et al, 2005; NELSON et al, 2000; TOZETTI et al, 2006). Por ser mais sensível, a PCR tem sido a mais utilizada universalmente (CARMO, FIORINI, 2007; GRAVITT et al, 2000; HUBBARD, 2003; JOHNSON et al, 2003; KOSEL et al, 2003; MOLIJN et al, 2005; MOYA et al, 2006; NELSON et al, 2000).

#### 2.2.5.1.1 Captura híbrida

O sistema de captura híbrida (HC2), realizado em microplacas, emprega uma solução hibridadora que utiliza anticorpos na captura do DNA viral com amplificação do sinal, o qual é detectado por quimioluminescência. Amostras contendo DNA hibridam-se com o coquetel de sondas específicas de RNA-HPV. O resultado dos híbridos RNA-DNA é capturado sob a superfície da microplaca recoberta com anticorpos específicos para os híbridos RNA-DNA (CARVALHO, OYAKAWA 2000).

O teste HC2 para HPV é capaz de detectar 18 tipos virais que infectam o trato anogenital. O grupo A possui sondas para os HPVs de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e o grupo B, sondas para os tipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (CARVALHO, OYAKAWA 2000).

#### **2.2.5.1.2 Reação em cadeia da polimerase**

A técnica de PCR, desenvolvida por Kary Mullis no fim da década de 1980, consiste na replicação *in vitro* de segmentos específicos de DNA pela enzima DNA polimerase (SAIKI, 1988). O princípio da reação está ilustrado na Figura 9. Por sua elevada sensibilidade e facilidade na interpretação dos resultados, tem sido o método de escolha para detecção do HPV para diagnóstico, para investigação científica e para estudos epidemiológicos (ELUF-NETO et al, 1994).

Para a detecção molecular do HPV por PCR têm sido desenvolvidas e usadas várias combinações de iniciadores genéricos para amplificar fragmentos de DNA de diferentes regiões do genoma viral (CHAN et al, 2006; HARNISH et al, 1999; HUBBARD, 2003; HUSNJAK et al, 2000; IFTNER, VILLA, 2003; KADO et al, 2001; KARLSEN et al, 1996; LEVI et al, 2002; QU et al, 1997; SNIJDERS et al, 1990). Entre os iniciadores, os mais empregados são MY09/11 (MANOS et al, 1989), GP5/GP6 (SNIJDERS et al, 1990), PGMY (GRAVITT et al, 2000), GP5+/GP6+ (de RODA HUSMAN et al, 1995), SPF10 (KLETER et al, 1998), LC1/LC2 (ASATO et al, 2004), LCR-E7 (SASAGAWA et al, 2000, 2001), pU-1m/pU-2R (FUJINAGA et al, 1991), região E1 (GREGOIRE et al, 1989), E6CF4/E7CR3 (YAMAGUCHI et al, 2002).

Estudos que avaliaram diferentes sistemas de iniciadores sugeriram que, para identificar todas as amostras infectadas com HPV, é necessário o uso de mais de um sistema simultaneamente (HARNISH et al, 1999; HUSNJAK et al, 2000, KADO et al, 2001; KARLSEN et al, 1996). Além disso, a sensibilidade e a especificidade da PCR podem variar de acordo com o sistema de iniciadores utilizados, o tamanho do fragmento amplificado, as condições de reação e a qualidade da DNA polimerase utilizada (CASTLE et al, 2002), bem como o espectro de tipos detectados e a

capacidade de detecção de infecções múltiplas (de VILLIERS, 1997; FREITAS et al, 2007; IFTNER, VILLA, 2003), pois alguns iniciadores podem amplificar preferencialmente certos tipos de HPV e, com isto, subestimar a prevalência da infecção por múltiplos tipos (CLIFFORD et al, 2006b; FEOLI-FONSECA et al, 2001).

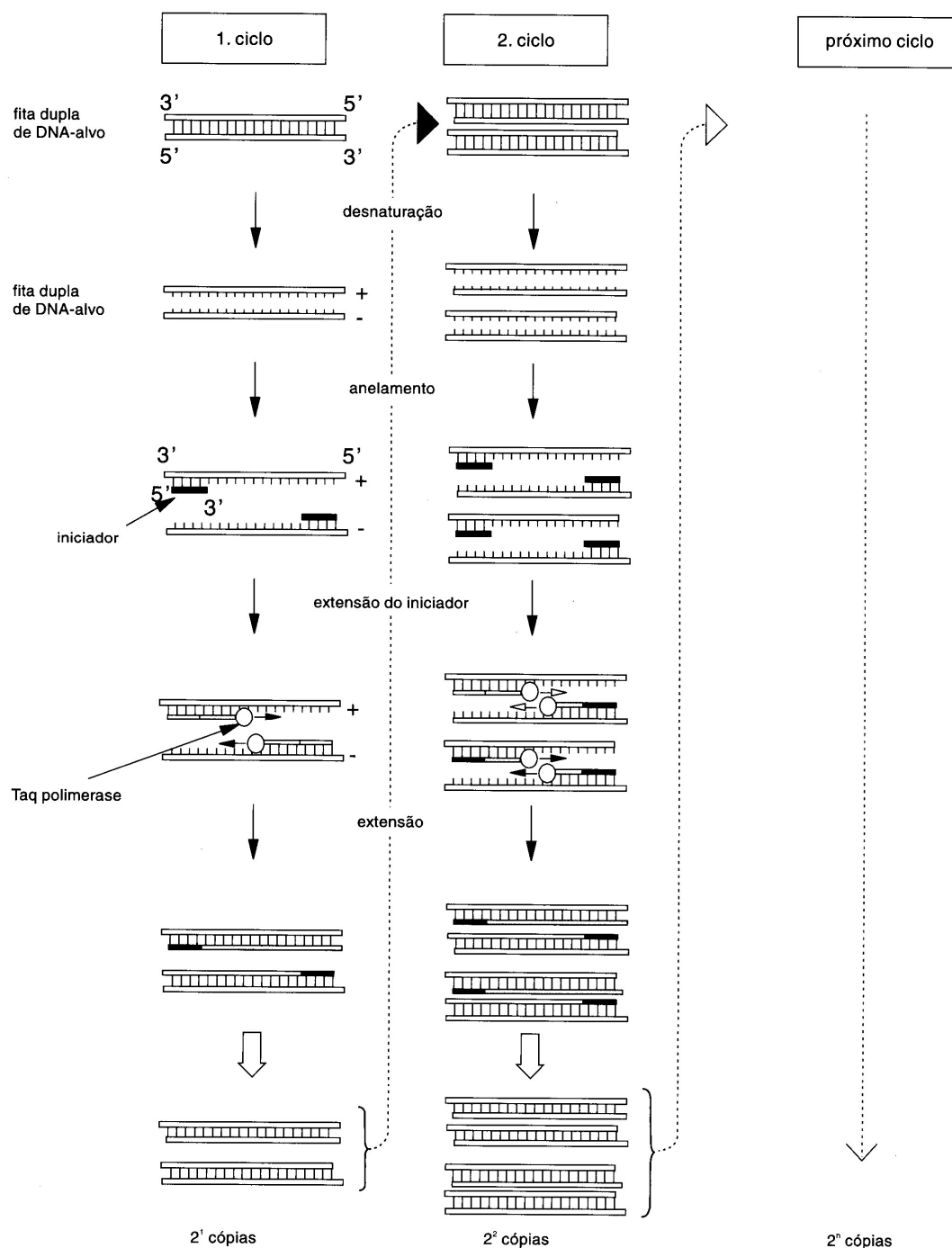
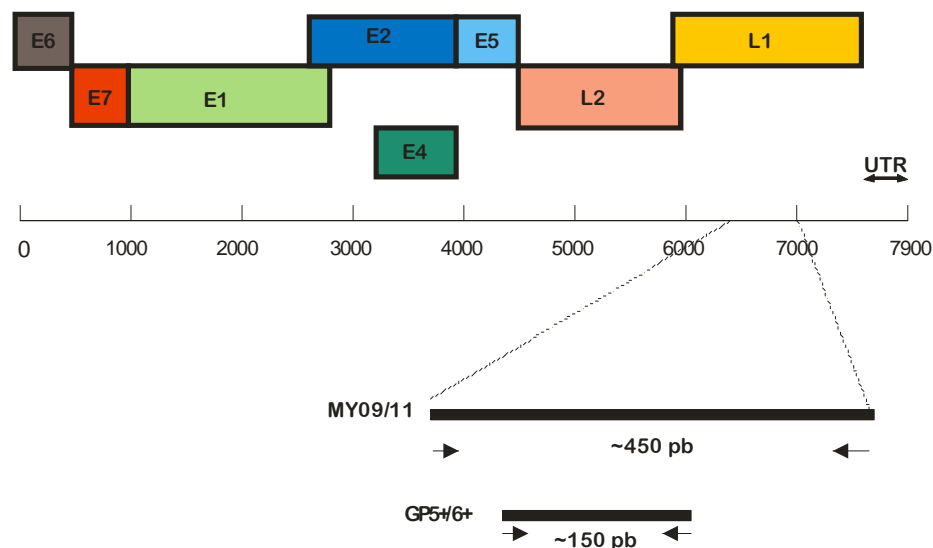


Figura 9: Princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é um processo térmico-cíclico que inclui três etapas. (1) desnaturação: a fita dupla de DNA-alvo é separada em duas fitas simples; (2) anelamento: iniciadores ligam-se especificamente à sequências complementares do DNA-alvo de fita simples; (3) extensão: DNA polimerase (p. ex, taq polimerase) gera fitas-filhas de DNA a partir da sequência original. As duas fitas recém-geradas servem como moldes para os ciclos subsequentes. Fonte: GROSS, BARRASSO, 1999.



O sistema que emprega os iniciadores MY09/MY11 (uma mistura de 24 oligonucleotídeos) e GP5+/GP6+, que amplificam parte do gene L1 (FIG. 10), são os mais frequentemente utilizados para a detecção do HPV em estudos clínicos e epidemiológicos. Tais iniciadores são eficazes para amplificação de um amplo espectro de genótipos de HPV em células obtidas por raspado cervical (ASTORI et al, 1997; CHAN et al, 2006; COUTLEE et al, 2002; de RODA et al, 1995; EVANDER et al, 1992; IFTNER, VILLA, 2003; JOHNSON et al, 2003; LEE et al, 2007; PEYTON et al, 2001; SILVA et al, 2006; SPEICH et al, 2004; STRAUSS et al, 1999; van den BRULE et al, 1990; WALBOOMERS et al, 1999) e em tecidos emblocados em parafina (HUANG et al, 2004; SMITH et al, 1992).



**Figura 10: Tamanho do produto amplificado pelos iniciadores MY09/11 e GP5+/6+. Fonte: MOLIJN et al, 2005. Modificado.**

Apesar de a região L1 poder ser perdida nos estágios avançados da neoplasia, a aplicação desses iniciadores, por serem sistemas universalmente utilizados em inúmeros trabalhos, permite uma melhor comparação dos resultados encontrados com os de outros estudos (EVANDER et al, 1992). Muitos trabalhos têm adotado esses iniciadores como padrão de referência para validação ou como padrão ouro para estudos comparativos com outras técnicas (BALERIOLA et al, 2008; FONTAINE et al, 2007). Estudos sugerem que a variação interlaboratorial na realização da PCR com iniciadores *consensus* da região L1 pode ser muito pequena

quando métodos bem validados são empregados por laboratórios de qualidade (HSING et al, 1996; KORNEGAY et al, 2003).

Estudos subsequentes demonstraram aumento significativo da sensibilidade da PCR quando os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+ são combinados em um sistema *nested* PCR (EVANDER et al, 1992; GIOVANNELLI et al, 2004; HUSNJAK et al, 2000; JOHNSON et al, 2003; NELSON et al, 2000; SOTLAR et al, 2004; STRAUSS et al, 1999).

### **2.2.5.2 Genotipagem do HPV**

A diversidade dos genótipos e a incidência de infecções múltiplas tornaram necessário o estabelecimento de métodos confiáveis para identificação dos vários tipos virais, não somente para estudos epidemiológicos como também para o acompanhamento de pacientes (DIDELOT-ROSSEAU et al, 2006; SOTLAR et al, 2004). Como ainda não existe nenhum teste aprovado formalmente para a genotipagem do HPV (MEIJER et al, 2006), vários métodos têm sido descritos para identificar os diferentes tipos do vírus (CARMO, FIORINI, 2007; CARESTIATO et al, 2006; HUBBARD, 2003; IFTNER, VILLA, 2003; MOLIJN et al, 2005).

A partir do uso da PCR com iniciadores genéricos, a detecção dos genótipos individuais pode ser feita por diferentes métodos, como RFLP (ASTORI et al, 1997; CHAN et al, 2006; ELLERBROCK et al, 2000; STRAUSS et al, 1999), LSSP (VILLA et al, 1995), hibridação com sondas (CASTLE et al, 2002; MENDEZ et al, 2005), hibridação reversa – HPV-LiPA (KLETER et al, 1999), PCR-EIA (JACOBS et al, 1997), hibridação reversa *line-blot* (PEYTON et al, 2001), sequenciamento nucleotídico (FONTAINE et al, 2007; GHARIZADEH et al, 2005; LEE et al, 2007; MONTALDO et al, 2007; VERTERAMO et al, 2006), DNA *Chip* (CHOI et al, 2005; LEE et al, 2005; LIN et al, 2007; MOYA et al, 2006) e PCR/microfluorometria (YAMAGUSHI et al, 2002).

Alguns *kits* com coquetéis de sondas específicas para vários tipos de HPV estão disponíveis comercialmente, sendo os mais utilizados o PGMY-LB Assay, que identifica 27 tipos (KORNEGAY et al, 2003), e o *Amplicor HPV test*, que reconhece

13 tipos de alto risco, ambos da *Roche Applied Science* (KOIDL et al, 2008); o INNO-LiPA, da *Innogenetics*, que identifica 25 tipos (DIDELOT-ROSSEAU et al, 2006; LEVI et al, 2002), e o Papillcheck, da *Greiner Bio-one*, que identifica 24 tipos (KOIDL et al, 2008). Segundo Levi (2002, 2004), esses kits apresentam como vantagem a identificação de múltiplos tipos, mas podem ocorrer reações cruzadas entre os tipos relacionados. Por apresentarem custo mais elevado em relação aos outros métodos, são menos utilizados.

A técnica de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) é um método molecular bastante utilizado para a tipagem do HPV em estudos epidemiológicos. O método consiste na obtenção de produtos amplificados, preferencialmente com os iniciadores MY09/11, seguida pela digestão do produto gerado de 450pb com enzimas de restrição, dentre as quais as mais utilizadas são BamHI, Ddel, HaeIII, HinfI, PstI, RsaI e Sau3A. O perfil de bandas produzido pela digestão por cada enzima é específico para cada tipo de HPV. Porém, em se tratando de amostras clínicas, que apresentam múltiplos tipos de HPVs, a eficácia dessa técnica de tipagem tem limitações, pois as enzimas digerem todos os produtos de PCR presentes na amostra, gerando um perfil de bandas misto em que, algumas vezes, não se consegue diferenciar os tipos virais (MOLIJN et al, 2005).

A técnica de PCR que utiliza um único iniciador específico em baixa estringência (LSSP-PCR), aplicada primeiramente em estudos para identificação de variações na sequência no DNA do genoma humano, também vem sendo utilizada para genotipagem do HPV a partir dos produtos amplificados com os iniciadores MY09/11 (PENNA et al, 1994; VILLA et al, 1995).

O sequenciamento do produto da reação de PCR, descrito inicialmente por Sanger (1981), vem sendo utilizado em muitos estudos como meio de tipagem do vírus, sendo considerado “padrão ouro” por alguns autores por permitir a identificação precisa de praticamente todos os tipos, inclusive com identificação de tipos raros e novos (ASATO et al, 2004; BALERIOLA et al, 2008; van den BRULE et al, 1992; FONTAINE et al, 2007; GHARIZADEH et al, 2005; GIOVANNELLI et al, 2004; LEE et al, 2007; SPEICH et al, 2004). Contudo, a identificação da sequência do DNA não é conseguida quando a amostra clínica contém múltiplos genótipos do

HPV, o que é um fenômeno comum em alguns grupos de pacientes. De acordo com alguns estudos, o uso do sequenciamento pode ainda, em alguns casos, subestimar a prevalência dos tipos nos casos de infecção múltipla, uma vez que pode ocorrer a amplificação apenas do tipo de maior prevalência na amostra (CAPRA et al, 2008; CHOI et al, 2005; JACOBS et al, 1999; KOSEL et al, 2003; MOLIJN et al, 2005; STRAUSS et al, 1999; VERNON et al, 2000; VERTERAMO et al, 2006).

Outra alternativa para genotipagem do HPV é a PCR com iniciadores específicos para cada tipo viral, com base em polimorfismos, principalmente das regiões E6 e E7. Trata-se de método altamente sensível, fácil de interpretar e que permite a caracterização dos tipos nos casos de infecção múltipla (CARESTIATO et al, 2006; FONTAINE et al, 2007; HUBBARD, 2003; GRCE et al, 2001; LEE et al, 2007; LIN et al, 2008; SOTLAR et al, 2004, TOZETTI et al, 2006). A seleção dos tipos virais a serem pesquisados deve ser baseada em estudos epidemiológicos e de prevalência, já que existe grande variação na distribuição dos genótipos em diferentes regiões do mundo. Sua principal limitação é a incapacidade de identificar genótipos virais na maioria das amostras clínicas, uma vez que depende de pesquisar, em cada reação, cada um das dezenas de tipos infectantes.

## **2.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS DA TIPAGEM DO HPV**

### **2.3.1 Valor prognóstico**

A tipagem do HPV cervical tem importante valor prognóstico e terapêutico, já que possibilita a distinção entre os HPVs de baixo e de alto risco oncogênico. A identificação dos genótipos de alto risco permite a seleção das pacientes com maior potencial de desenvolver câncer cervical (LEE et al, 2005; NELSON et al, 2000; SPEICH et al, 2004; STRAUSS et al, 1999); infecção persistente por HPVs de alto risco é considerada fator de risco para a progressão neoplásica, tendo os genótipos papel muito importante na evolução do caso. (JOHNSON et al, 2003; LEE et al, 2007; MONTALDO et al, 2007; NOBBENHUIS et al, 1999).

### **2.3.2 Desenvolvimento de estratégias de vacinas**

O conhecimento da distribuição dos tipos oncogênicos mais prevalentes nas diferentes regiões geográficas e nas distintas populações contribui para o planejamento de estratégias de vacinas e, conseqüentemente, possibilita avaliar os benefícios da implementação das mesmas, já que a vacina é tipo-específica (BOSCH et al, 1995; CHAN et al, 2006; FREITAS et al, 2007; ORTIZ et al, 2006).

### **2.3.3 Exame complementar**

Os testes moleculares têm mostrado ser uma ferramenta valiosa para confirmação diagnóstica da infecção pelo HPV (JOHNSON et al, 2003) e dado grande contribuição aos estudos de investigação epidemiológica e de prevalência em todo o mundo (YOUNG et al, 1989). Apesar de o teste de Papanicolau e a colposcopia serem abordagens bem estabelecidas e as mais utilizadas para o rastreamento do câncer cervical, o papel da genotipagem do HPV complementa as limitações desses testes de forma a contribuir para melhor conhecer a infecção e seu potencial evolutivo (CHOW et al, 2000; KOSEL et al, 2003; LORENZATO et al, 2000; NAMKOONG, 1995; SILVA et al, 2006).

## **2.4 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Existe hoje grande preocupação em torno do aperfeiçoamento dos métodos de detecção do HPV, razão pela qual a introdução de novas abordagens diagnósticas, tais como as moleculares, representa notável avanço. Devido aos resultados rápidos e precisos das técnicas de biologia molecular, é provável que os laboratórios existentes na prática clínica tendam a utilizar estas técnicas como rotina de trabalho e também para a confirmação do diagnóstico realizado por outros métodos.

A genotipagem do vírus ao longo dos últimos anos vem se tornando um componente importante na abordagem do câncer cervical. A busca por um método de genotipagem eficaz para o HPV tem sido motivo de muitas investigações, devido à sua importância e à grande contribuição no diagnóstico das infecções e melhor

entendimento da relação do HPV no processo da patogênese do câncer, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas tipo-específicas.

O presente estudo buscou comparar dois métodos empregados para a genotipagem do HPV, visando-se propor uma estratégia eficaz para a genotipagem viral na prática clínica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Comparar dois diferentes métodos de tipagem (PCR tipo-específica e sequenciamento) do HPV em amostras de raspado cervical.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar os tipos de HPVs;
- Comparar a eficácia dos dois métodos de tipagem, com vistas a avaliar a possibilidade de sua aplicação na prática clínica;
- Propor uma estratégia de genotipagem a ser empregada na prática clínica.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas**

Este estudo faz parte do “Projeto multicêntrico para controle e prevenção das lesões cervicais de alto grau e do câncer cérvico-uterino em mulheres portadoras do HIV”, que se destina a investigar o papel do HPV no câncer cervical em pacientes infectadas pelo HIV. Este projeto, em desenvolvimento na UFMG desde 2002, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Anexo A), juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). O presente sub-projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG em 28/02/07 (Anexo C).

### **4.2 Casuística**

#### **4.2.1 Amostras**

Foram empregadas amostras obtidas de mulheres infectadas pelo HIV que participam do Projeto Multicêntrico para detecção do HPV cervical e que são atendidas rotineiramente neste estudo. Após exclusão das amostras com PCR negativo e/ou inadequadas para o diagnóstico molecular, fazem parte deste estudo 260 amostras com PCR positivo para HPV.

### **4.3 Metodologia**

#### **4.3.1 Coleta das amostras**

As amostras foram coletadas por ginecologistas participantes do Projeto Multicêntrico e colhidas por meio de raspado da mucosa cérvico-vaginal, com auxílio da espátula de Ayre. O material assim obtido foi colocado em um tubo apropriado contendo aproximadamente 2 ml de solução salina fisiológica (NaCl 0,09%). Os tubos foram rotulados com os dados da paciente e entregues ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio e Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG. Caso não pudesse ser



enviado imediatamente ao laboratório, o material era conservado em geladeira até sua entrega, o que sempre ocorreu em no máximo 24 horas após a coleta.

#### 4.3.2 Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o método descrito por Walsh et al (1991), com pequenas modificações, em ambiente apropriado (FIG. 11). De forma resumida, as etapas do procedimento estão descritas abaixo:

- 1- Homogeneizou-se o tubo da amostra em vórtex;
- 2- Transferiu-se toda a amostra para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf), previamente identificados com data, código da amostra e nome da paciente;
- 3- Centrifugou-se por 1 minuto a 14.000 rpm, para formação do sedimento;
- 4- Descartou-se o sobrenadante por inversão, deixando cerca de 100µl junto ao sedimento;
- 5- Adicionaram-se 200µl da solução de resina quelante *chelex-100* (BioRad) a 20% contendo SDS a 10%, preparada no laboratório;
- 6- Colocaram-se os tubos em um banho-seco a 100°C por 20 minutos;
- 7- Armazenaram-se os tubos a -20°C até o momento da realização da PCR.



**Figura 11: Sala de extração – capela de fluxo laminar onde é realizada a extração do DNA.**

### **4.3.3 Reação em cadeia da polimerase**

#### **4.3.3.1 Amplificação do gene da globina e detecção do HPV**

O DNA de todas as amostras foi submetido primeiramente à amplificação para o gene da globina, que é utilizado para avaliar a qualidade do DNA extraído. As amostras que não amplificaram o gene da globina foram excluídas do estudo. Os iniciadores usados estão indicados na Tabela 4.

**TABELA 4**  
**Conjunto de iniciadores utilizados para detecção do gene da globina e do HPV**

Sistema	Sequências Nucleotídicas	Região do genoma Viral	Fragmento Amplificado
Globina A	5'CTAGCAACCTCAAACAGACA3'		
Globina B	5'TGCCTATCAGAAACCCAAAGA3'		204pb
Geral A (MY09)	5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3'	L1	
Geral B (MY11)	5'GCMCAGGGWCATAAAYAATGG3		450pb
Geral Interno A (GP5+)	5'TTTGTTTACTGTGGTAGATAC3'	L1	
Geral Interno B (GP6+)	5'GAAAATAAACTGTAAATCA3'		137pb

*As condições da PCR estão descritas abaixo:*

**Mix para PCR – Gene da Globina:**

Tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)	5µl
MgCl <sub>2</sub>	3µl
dNTPs [200 µM]	1µl
Iniciador A [10 pmol/µl]	2,5µl
Iniciador B [10 pmol/µl]	2,5µl
Taq DNA polimerase (2,5 UI)	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	25,75µl
<b>Total</b>	<b>40µl</b>

Ao mix foram adicionados 10µl do DNA extraído, formando-se volume final de 50µl. Em cada conjunto de reações de PCR realizadas de cada vez, foi feita amplificação com um controle positivo – DNA humano purificado - K562 (Promega), para garantir que houve amplificação de DNA e um controle negativo (ddH<sub>2</sub>O), para garantir que não houve contaminação durante o procedimento.

Os tubos foram colocados no termociclador (Biocycler, modelo MJ96+/MJ96G), usando-se o programa indicado na página 56. Em seguida, os

produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% tratado com brometo de etídio, conforme descrito no item 4.3.3.2.

Para detecção do HPV, o DNA extraído foi amplificado por meio de PCR e *nested* PCR, usando-se os conjuntos de iniciadores MY09/MY11 (MANOS et al, 1989) e GP5+/GP6+ (de RODA HUSMAN et al, 1995), respectivamente, os quais estão descritos na tabela 4. Foram utilizados controle positivo (amostra sabidamente positiva para HPV) e controle negativo (DNA humano purificado - K562 Promega). O *mix* da reação foi realizado segundo as condições descritas abaixo:

**Mix para PCR - Sistema MY09/11:**

Tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)	5µl
MgCl <sub>2</sub>	3µl
dNTPs [200 µM]	1µl
Iniciador A [25 pmol/µl]	2,5µl
Iniciador B [25 pmol/µl]	2,5µl
Taq DNA polimerase (2,5 UI)	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	25,75µl
<b>Total</b>	<b>40µl</b>

Ao mix foram adicionados 10µl do DNA extraído da amostra, formando-se volume de 50µl. Os tubos foram colocados no termociclador e submetidos ao programa descrito na página 56.

**Mix para PCR - Sistema GP5+/GP6+:**

Tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)	5µl
MgCl <sub>2</sub>	3µl
dNTPs [200 µM]	1µl
Iniciador A [10 pmol/µl]	1µl
Iniciador B [10 pmol/µl]	1µl
Taq DNA polimerase (2,5 UI)	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	37,75µl
<b>Total</b>	<b>49µl</b>

Para a reação de *nested* PCR, ao mix foi adicionado 1µl do produto amplificado pelo sistema MY09/11, incluindo os controles, formando-se o volume final de 50µl. Os tubos foram colocados no termociclador, segundo programa descrito adiante. Os produtos da PCR foram aplicados em gel agarose 2% tratado com brometo de etídio, conforme descrito no item 4.3.3.2.

**Programas usados para amplificação:**

1. Programa HPV A (usado para amplificar o gene da globina e para o sistema MY09/11):

1- 94°C.....1'  
 2- 90°C.....30"  
 3- 54°C.....2'  
 4- 72°C .....1'  
 5- repetir o passo 2 30 vezes  
 6-72°C .....10'  
 7- 4°C .....infinito.

2. Programa HPV *nested* (usado para o sistema GP5+/GP6+):

1- 94°C.....4'  
 2- 94°C.....30"  
 3- 45°C.....1'  
 4- 72°C .....1'30"  
 5- repetir o passo 2 por 40 vezes  
 6- 72°C .....10'  
 8- 4°C .....infinito.

#### 4.3.3.2 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% tratado com brometo de etídio. Aos tubos contendo o produto da PCR foram adicionados 5 $\mu$ l de corante azul de bromofenol (*Sigma*). Em cada canaleta do gel, foram aplicados 20 $\mu$ l do produto amplificado, padrão de peso molecular e controles (positivo e negativo) da reação de PCR.

O resultado foi visualizado sob transluminador de luz UV e analisado a partir da comparação visual dos fragmentos de DNA obtidos com o padrão de peso molecular (500pb-*Invitrogen*). Todos os géis foram fotografados pelo sistema de captura de imagem digital (LPIX – Loccus Biotecnologia, Figura 12), gravados eletronicamente e impressos para arquivo.



**Figura 12: Sala de documentação – Sistema de captura digital para documentação dos géis tratados com brometo de etídio.**

#### 4.3.3.3 Genotipagem por PCR tipo-específica

Para a genotipagem por PCR, foram realizadas reações independentes para cada tipo de HPV, sendo pesquisados os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35. Os iniciadores usados estão descritos na tabela 5. As condições de preparação do mix e os programas de amplificação estão descritos adiante.

**TABELA 5**  
**Conjunto de iniciadores utilizados para tipagem do HPV por PCR tipo-específica**

<b>Tipos</b>	<b>Sequências Nucleotídicas</b>	<b>Região do Genoma Viral</b>	<b>Fragmento Amplificado</b>
6A	5'-TAGGGGACGGTCCTCTATTC-3'		
6B	5'-GCAACAGCCTCTGAGTCACA-3'	LCR	258-361pb
11A	5'-GAATACATGCGCCATGTGGA-3'		
11B	5'-AGCAGACGTCCGTCCTCGAT-3'	L1	356pb
16A	5'-TCAAAGCCACTGTGTCCTG-3'		
16B	5'-CGTGTTCTTGATGATCTGCAA-3'	E6	271pb
18A	5'-TGGTGTATAGAGACAGTATAACCCA-3'		
18B	5'-GCCTCTATAGTCCCAGGTATGT-3'	E6	247pb
31A	5'-TGAACCGAAAACGGTTGGTA-3'		
31B	5'-CTCATCTGAGCTGTCCGGTA-3'	E6/E7	613pb
33A	5'-AGTAGGGTGTAACCGAAAGC-3'		
33B	5'-CTTGAGGACACAAAGGTCTT-3'	E6	411pb
35A	5'-GAATTACAGCGGAGTGAGGT-3'		
35B	5'-CACCGTCCACCGATGTTATG-3'	E6	290pb

**Fonte: ARNDT et al, 1994 e DUGGAN et al, 1994**

**Mix para PCR tipo-específica:**

Tampão 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8], 500mM KCl)	5µl
MgCl <sub>2</sub>	3µl
dNTPs [10mM]	1µl
Iniciador A [10 pmol/µl]	2,5µl
Iniciador B [10 pmol/µl]	2,5µl
Taq DNA polimerase (2,5 UI)	0,25µl
ddH <sub>2</sub> O	30,75µl
<b>Total</b>	<b>45µl</b>

Ao mix foram adicionados 5µl do DNA extraído, formando-se volume final de 50µl. Os programas de amplificação utilizados para as reações de tipagem foram padronizados segundo a temperatura ideal para anelamento de cada iniciador, conforme os programas indicados abaixo. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel agarose de 2% tratado com brometo de etídio, conforme descrito em 4.3.3.2.

**Programa HPV A (usado para os tipos 16, 31 e 35):**

- 1- 94°C.....1'
- 2- 90°C.....30''
- 3- 54°C.....2'
- 4- 72°C .....1'
- 5- repetir o passo 2 30 vezes
- 6- 72°C .....10'
- 7- 4°C .....infinito.

**Programa HPV B (usado para o tipo 33):**

- 1- 94°C.....1'
- 2- 90°C.....30''
- 3- 50°C.....2'
- 4- 72°C .....1'
- 5- repetir o passo 2 30 vezes



- 6- 72°C .....10'
- 7- 4°C .....infinito.

**Programa HPV C (usado para o tipo 18):**

- 1- 94°C.....1'
- 2- 90°C.....30''
- 3- 58°C.....2'
- 4- 72°C .....1'
- 5- voltar ao passo 2 30 vezes
- 6- 72°C .....10'
- 7- 4°C .....infinito.

**Programa HPV D (usado para o tipo 6):**

- 1- 94°C.....1'
- 2- 90°C.....30''
- 3- 56°C.....2'
- 4- 72°C .....1'
- 5- repetir o passo 2 30 vezes
- 6- 72°C .....10'
- 7- 4°C .....infinito.

**Programa HPV E (usado para o tipo 11):**

- 1- 94°C.....1'
- 2- 90°C.....30''
- 3- 61°C.....2'
- 4- 72°C .....1'
- 5- repetir o passo 2 30 vezes
- 6- 72°C .....10'
- 7- 4°C .....infinito.

#### 4.3.3.4 Genotipagem por sequenciamento

Para sequenciamento, foram utilizados 30µl do produto da *nested* PCR. O produto foi purificado seguindo-se protocolo de precipitação por purificação alcoólica adaptado de *Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide* (Applied Biosystems) desenvolvido no laboratório NUPAD, conforme descrito abaixo.

1 – A cada tubo contendo o produto de PCR adicionaram-se 120µl de isopropanol a 70%, homogeneizou-se em vórtex e manteve-se à temperatura ambiente por 15 minutos;

2 – Centrifugou-se por 30 minutos a 14.000 rpm, para formação do precipitado;

3 – Descartou-se o sobrenadante;

4 – Adicionaram-se 100µl de etanol 70% a cada tubo, agitou-se em multivórtex por 1 minuto e centrifugou-se por 15 minutos a 14.000 rpm;

5 – Descartou-se o sobrenadante, sendo repetido o passo 4;

6 – Descartou-se todo o sobrenadante e adicionaram-se 30µl de ddH<sub>2</sub>O.

Após a purificação, o DNA foi submetido à quantificação em gel agarose 2% tratado com brometo de etídio, no qual foram aplicados 5µl do DNA purificado juntamente com 5µl de corante azul de bromofenol (*Sigma*) e padrão de peso molecular *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen), que é usado como parâmetro para a quantificação do DNA baseado na intensidade da banda evidenciada no gel.

A reação de sequenciamento foi realizada usando-se o *kit BigDye Terminator* (Applied Biosystems), versão 3.1, e o iniciador Gp6+ (4pmol/µl), segundo instruções do fabricante.

**Programa de amplificação utilizado para sequenciamento:**

- 1- 96°C.....10''
- 2- 50°C.....5''
- 3- 60°C.....4'
- 4- repetir o passo 1 25 vezes
- 6- 4°C .....infinito.

Após a reação de sequenciamento, foi realizada nova precipitação por purificação alcoólica, segundo o protocolo abaixo:

1 – A cada tubo contendo o produto de PCR adicionaram-se 80µl de isopropanol a 70%, homogeneizou-se em vórtex e manteve-se à temperatura ambiente por 20 minutos;

2 – Centrifugou-se por 25 minutos a 13.000 rpm;

3 – Descartou-se o sobrenadante;

4 – Adicionaram-se 250µl de etanol 70% a cada tubo, agitou-se em multivórtex por 2 minutos e centrifugou-se por 5 minutos a 13.000 rpm;

5 – Descartou-se o sobrenadante; colocaram-se os tubos em banho seco a 95°C por 1 minuto com a tampa aberta, para secar;

7 – Os tubos foram armazenados secos a -20°C até o momento de uso.

Após adicionarem-se 12µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada tubo, o volume total foi aplicado em placa e colocado no sequenciador automático (Applied Biosystems, modelo ABI Prism 3100-*Avant* Genetic Analyser, Figura 13).



**Figura 13: Sala de pós-amplificação – Sequenciador automático.**

#### **4.3.3.4.1 Análise das sequências**

A escolha da região a ser analisada foi baseada nos polimorfismos encontrados na região amplificada (L1), mediante alinhamento da sequência nucleotídica dos principais tipos virais identificados até o momento, cujas sequências estão disponíveis no site ICTVdB (<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/>).

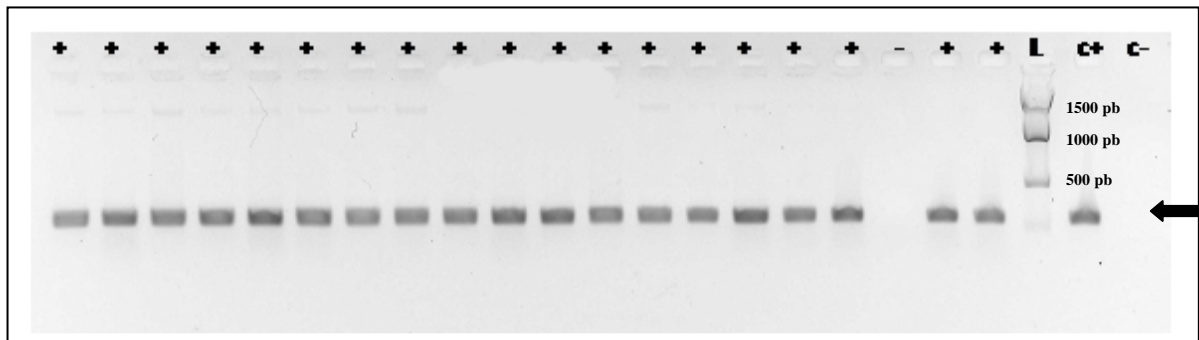
As sequências obtidas foram analisadas por meio do software *sequencing analysis* (versão 3.7). Cada sequência foi editada, sendo selecionada a região de interesse, correspondente a 30 bases de nucleotídeos (FEOLI-FONSECA et al, 1998; GHARIZADEH et al, 2001; LEE et al, 2007), por meio do programa de alinhamento *Bioedit* (versão 7.0) (HALL, 1999). A sequência de interesse foi alinhada com sequências de referência disponíveis e comparada por consulta ao *GeneBank*, banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, possibilitando a identificação do genótipo viral. Todos os dados foram gravados eletronicamente.

#### **4.3.4 Análise estatística**

Para comparar a eficácia dos dois métodos em identificar o tipo viral presente nas amostras, foi utilizado o teste Mcnemar (PAGANO, GAUVREAU, 2004).

## 5. RESULTADOS

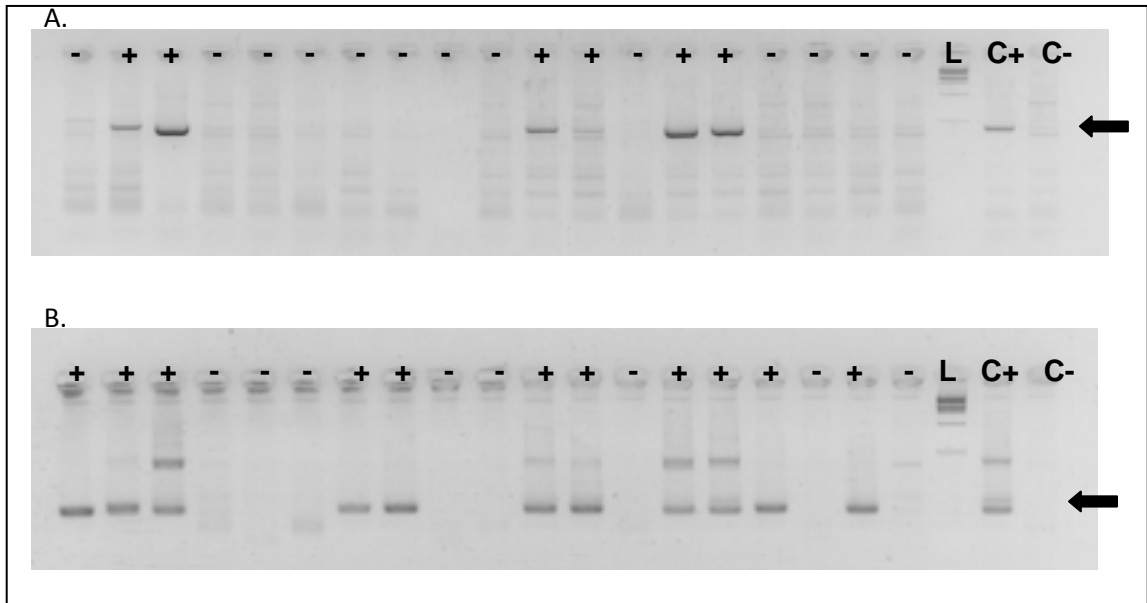
Na Figura 14, encontra-se gel representativo da amplificação do fragmento do gene da globina, que tem 204pb. Verifica-se também ausência do fragmento na canaleta correspondente a uma amostra sem amplificação (-), bem como no controle negativo da reação. No gel são mostrados ainda controles positivos e negativos da reação.



**Figura 14:** Gel representativo da amplificação do fragmento de 204pb do gene da globina (indicado pela seta). L = Marcador de peso molecular 500pb (*Invitrogen*); + = amostra positiva; - = amostra negativa; C+ = controle positivo da reação; C- = controle negativo da reação.

Na Figura 15, encontram-se géis representativos da amplificação dos fragmentos virais. Em (A), observa-se fragmento de aproximadamente 450pb (MY09/11) nas canaletas correspondentes às amostras que tiveram amplificação para o HPV (+), bem como na canaleta do controle positivo da reação; nota-se também ausência do fragmento-alvo nas canaletas correspondentes às amostras negativas (-) e no controle negativo da reação. Pode-se observar pequena variação no tamanho dos produtos de PCR obtidos pela amplificação de diferentes pacientes, possivelmente devido a tipos distintos de HPV nas amostras. Em (B), fragmento de aproximadamente 150pb (GP5+/6+), resultante da amplificação pelo sistema *nested* PCR.

## RESULTADOS



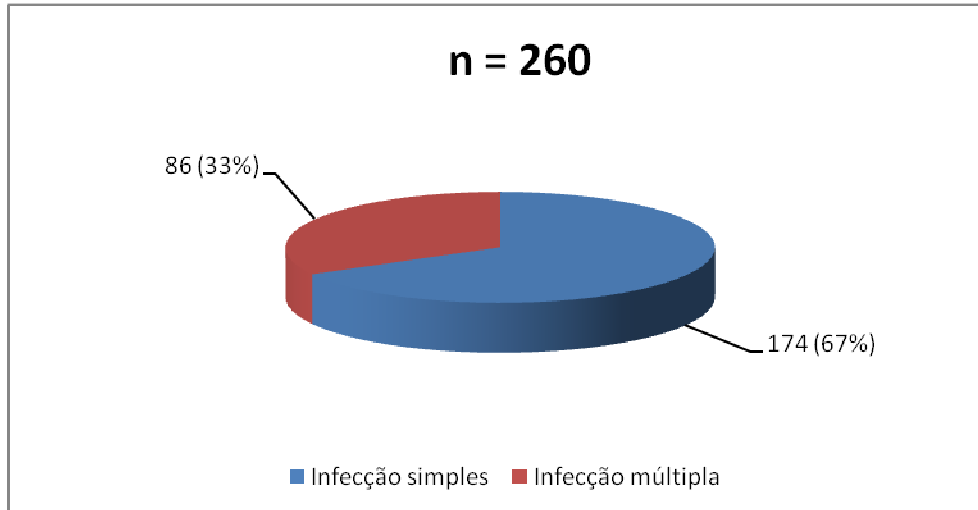
**Figura 15: Géis representativos da amplificação dos fragmentos genéricos da região L1 do genoma do HPV. A) amplificação do fragmento genérico de 450pb. B) amplificação do fragmento genérico de 150pb. O fragmento-alvo está indicado pela seta. L = Marcador de peso molecular 500pb (*Invitrogen*); + = amostra positiva; - = amostra negativa; C+ = controle positivo da reação; C- = controle negativo da reação.**

### 5.1 Tipagem

Usando-se as duas metodologias empregadas no estudo (PCR tipo-específica e sequenciamento), o genótipo foi identificado em 227 (87%) das 260 amostras analisadas. Em 33 casos (13%), não foi possível identificar o genótipo viral devido à presença de tipos não identificados pelo painel pesquisado pela PCR tipo-específica e à existência de infecção por múltiplos tipos, o que não permitiu a tipagem pelo sequenciamento.

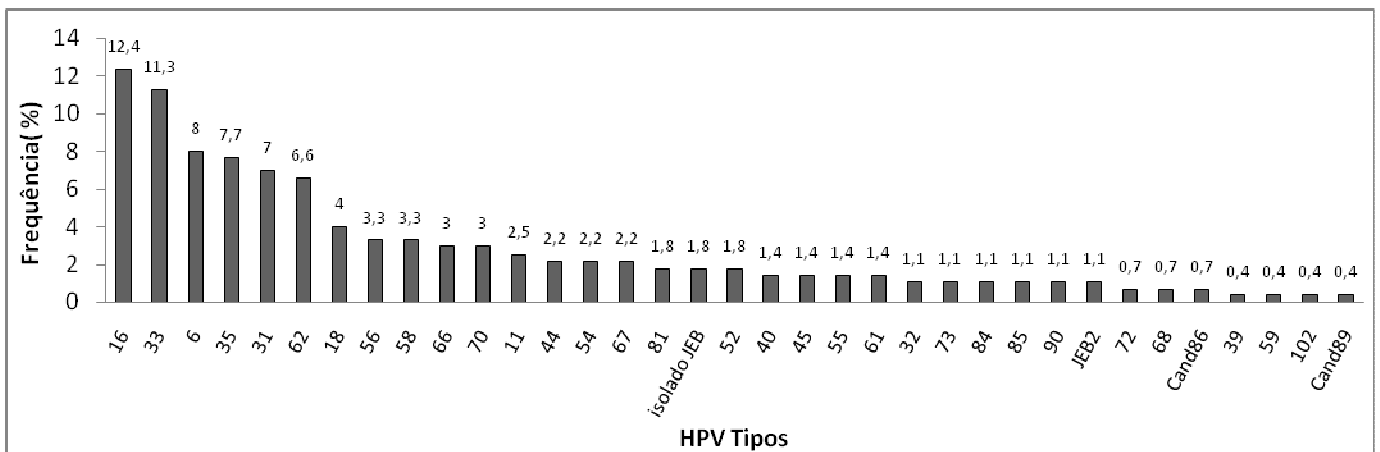
Quanto ao tipo de infecção, 174 casos corresponderam a infecção simples (identificado somente um tipo viral) e 86 casos, a infecção múltipla (mais de um tipo viral), conforme ilustrado no Gráfico 1.

## RESULTADOS



**Gráfico 1: Número de casos em relação ao tipo de infecção.**

Além dos sete tipos pesquisados pela PCR tipo-específica (tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35), foram identificados pelo sequenciamento outros 28 tipos (32, 39, 40, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 62, 61, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 84, 85, 90, 102, *cand86*, *cand89* e dois tipos ainda não classificados taxonomicamente, o isolado JEB e o tipo JEB2). Considerando ambas as metodologias, no Gráfico 2 consta a frequência dos 35 tipos identificados no estudo; a Tabela 6 mostra os tipos identificados por caso.



**Gráfico 2: Frequência dos tipos de HPV identificados no estudo**



**TABELA 6**  
**Genótipos identificados por caso**

Infecções Simples		Infecções múltiplas	
HPV tipos	nº de casos	HPV tipos	nº de casos
6	20	<b>33</b> e outro (s)	8
<b>16*</b>	17	<b>33 e 67</b>	4
62	15	<b>33 e 58</b>	4
<b>56</b>	8	<b>16, 31 e 33</b>	3
<b>66</b>	8	<b>16 e 35</b>	3
<b>70</b>	8	<b>31 e 35</b>	3
<b>18</b>	6	<b>16</b> e outro (s)	3
11	6	<b>31</b> e outro (s)	3
<b>35</b>	6	<b>16, 33 e 35</b>	2
44	6	<b>16 e 18</b>	2
<b>31</b>	6	<b>35</b> e outro (s)	2
54	5	<b>16, 31, 33 e 35</b>	1
81	5	6, <b>16, 33 e 35</b>	1
Isolado JEB	5	6, <b>18 e 33</b>	1
40	4	<b>18, 31 e 33</b>	1
<b>45</b>	4	<b>33, 56 e 58</b>	1
<b>52</b>	4	<b>33</b> , 62 e outro (s)	1
55	4	<b>16 e 31</b>	1
<b>58</b>	4	<b>31 e 35</b>	1
61	4	<b>18 e 33</b>	1
32	3	<b>16 e 33</b>	1
<b>73</b>	3	<b>33</b> e 62	1
84	3	<b>52 e 67</b>	1
85	3	<b>35</b> e JEB2	1
90	3	<b>35</b> e 54	1
72	2	62 e outro (s)	1
<b>68</b>	2	11 e outro (s)	1
Cand86	2	Tipo não identificado	33
JEB2	2	<b>Sub-total</b>	<b>86</b>
<b>33</b>	1		
<b>39</b>	1		
<b>59</b>	1		
<b>67</b>	1		
102	1		
Cand89	1		
<b>Sub-total</b>	<b>174</b>		
Total	260		

\* Em vermelho, tipos de HPV de alto risco oncogênico, segundo de Villiers et al (2004).

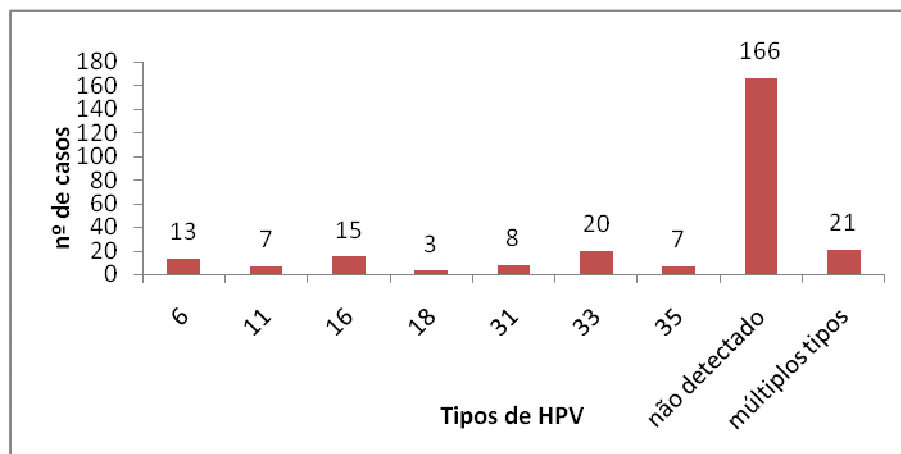
## RESULTADOS

Os tipos virais mais frequentes no estudo, considerando infecção simples e múltipla, foram HPV 16 (12,4%), HPV 33 (11,3%) e HPV 6 (8%) (GRAF. 2), sendo que nas infecções simples os tipos mais frequentes foram o HPV6 (20 casos), seguido pelo HPV16 (17 casos); em relação às infecções múltiplas, a combinação mais frequente foi HPV33 e HPVX (tipo não identificado), seguido pelo HPV33 e HPV67, HPV33 e HPV58 (Tabela 6).

Dos 35 tipos identificados, 16 são considerados de alto risco oncogênico segundo a classificação proposta por de Villiers (2004) com frequência global de 63%. Nas infecções simples, foi observada distribuição homogênea dos tipos de baixo e alto risco oncogênicos, enquanto nas infecções múltiplas houve predominância dos tipos de alto risco.

### 5.1.1 PCR tipo-específica para os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35

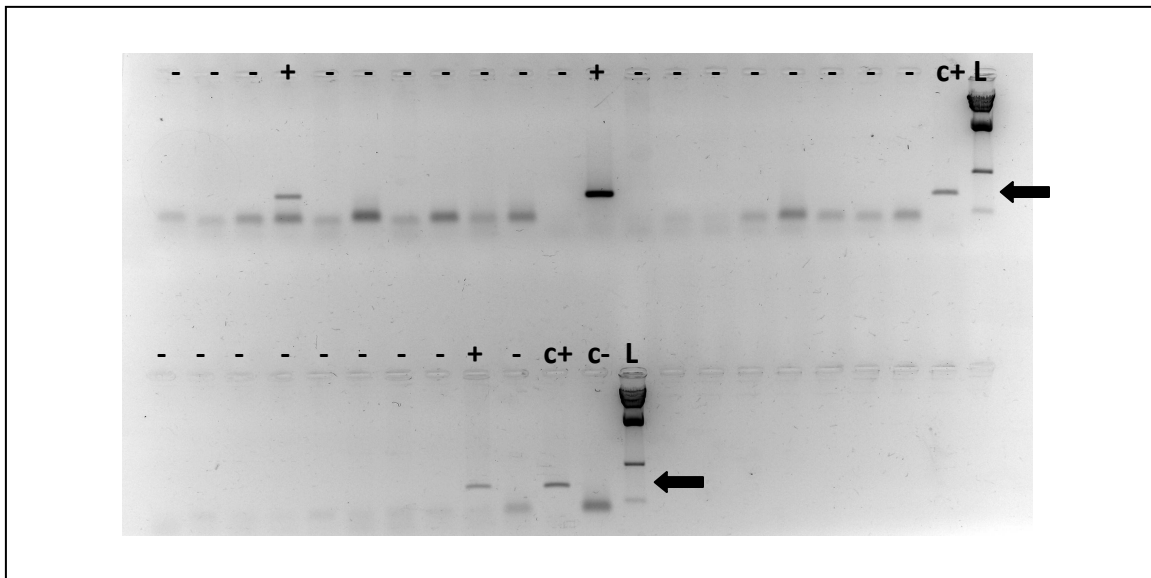
Com a técnica de PCR tipo-específica para os sete tipos pesquisados, foi possível genotipar o vírus em 94/260 (36%) casos, sendo que em 21 foi identificado mais de um tipo viral. Por meio dessa estratégia, o tipo viral não foi identificado na maioria dos casos (166/260, 64%), conforme ilustrado no Gráfico 3.



**Gráfico 3: Genotipagem do HPV pela PCR tipo-específica.**

## RESULTADOS

Na Figura 16, encontra-se gel representativo da amplificação do fragmento viral para o HPV16. Como indicado pela posição das setas, nota-se fragmento de aproximadamente 271pb nas canaletas correspondentes às amostras que obtiveram amplificação positiva (+), da mesma forma que na canaleta do controle positivo da reação. Nota-se também ausência do fragmento-alvo nas canaletas correspondentes às amostras negativas (-) e no controle negativo da reação.



**Figura 16: Gel representativo da amplificação por PCR tipo-específica do fragmento do HPV16. L = Marcador de peso molecular 500pb (*Invitrogen*); + = amostra positiva; - = amostra negativa; C+ = controle positivo da reação; C- = controle negativo da reação.**

### 5.1.2 Sequenciamento direto do produto amplificado

Por meio do sequenciamento do produto amplificado, o tipo viral foi identificado em 196/260 (75%) casos, sendo que 123 corresponderam a tipos diferentes do painel pesquisado pela PCR específica. Na figura 17 estão ilustrados exemplos de eletroferogramas referentes ao sequenciamento. Quando havia mais de um tipo viral na amostra, caracterizada pela sobreposição de sequências como ilustrado na Figura 17B, encontrada em 68/260 (26%) casos, só foi possível identificar os tipos em quatro casos, permanecendo, portanto, 64/260 (25%) casos sem tipagem definida. Os resultados da tipagem pelo sequenciamento estão indicados no Gráfico 4.

## RESULTADOS



Figura 17: Eletroferogramas. A) Infecção simples. Sequência nucleotídica referente ao HPV 70. B) Infecção múltipla. Sobreposição de seqüências virais (setas).

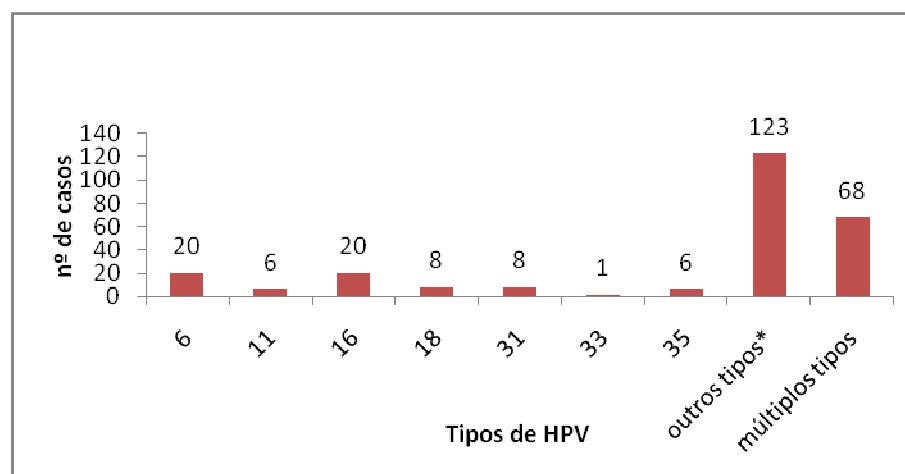


Gráfico 4: Genotipagem do HPV pelo sequenciamento.

\* Tipos de HPV identificados pelo sequenciamento: 32, 39, 40, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 62, 61, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 84, 85, 90, 102, *cand86*, *cand89*, isolado JEB e JEB2.

## 5.2 Comparação PCR tipo-específica e sequenciamento

Quando se comparou a eficácia dos dois métodos em identificar os tipos de HPV presentes nas amostras, o resultado da análise mostrou que, ao nível de significância de 95%, a frequência de amostras com genótipo identificado pelo método de sequenciamento é maior que a do identificado pelo método da PCR específica para os sete tipos estudados ( $p = 0,00$ ).

A razão de chances estimada foi de que o sequenciamento tem 4,2 vezes mais chances de identificar o tipo viral presente em amostras positivas do que a PCR tipo-específica para os sete tipos pesquisados (Tabela 7).

**TABELA 7**  
**Análise PCR tipo-específica x sequenciamento**

SEQUENCIAMENTO	PCR ESPECÍFICA		Total
	Tipo identificado	Tipo não identificado	
Tipo identificado	63	133	196
Tipo não identificado	31	33	64
Total	94	166	260

IC de 95% par OR:  $[2,90 \leq OR_{\text{estimado}} \geq 6,34]$

OR:  $133/31=4,29$

Quando se comparou a PCR tipo-específica e o sequenciamento considerando apenas os sete tipos pesquisados (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35) nos casos de infecção simples, o método de sequenciamento mostrou-se mais sensível. A Tabela 8 mostra os resultados comparativos.

**TABELA 8**  
**Tipagem do HPV por PCR tipo-específica e por sequenciamento nos casos de**  
**infecção simples**

Tipo HPV	Nº de casos	
	PCR Tipo-específica	Sequenciamento
6	13	<b>20</b>
11	6	6
16	12	<b>17</b>
18	3	<b>6</b>
31	5	<b>6</b>
33	1	1
35	3	<b>6</b>
Sub-total	<b>43</b>	<b>62</b>
Outro tipo	NA	112
Total	<b>43</b>	<b>174</b>

NA = não aplicável

Quanto às infecções múltiplas, a técnica de PCR tipo-específica identificou mais de um tipo viral em 21/86 (24%) casos; em sete deles o sequenciamento falhou em identificar múltiplos tipos, reconhecendo apenas um dos tipos presente na amostra (Tabela 9). Por meio do sequenciamento, foram identificados 68/86 casos de infecção múltipla, sendo que em apenas 4/86 (4,6%) casos foi possível distinguir os tipos ou pelo menos um deles. Considerando-se o resultado das duas técnicas juntas, os tipos ou pelo menos um deles foram identificados em 53/86 (62%) casos de infecções múltiplas, sendo que em 12 o resultado da tipagem foi diferente entre os dois métodos empregados (Tabela 10). Nesses casos, foi considerado haver dois tipos ou mais na amostra, uma vez que o sequenciamento pode falhar na identificação de múltiplos tipos.

**TABELA 9**  
**Tipagem do HPV por PCR tipo-específica e por sequenciamento nos casos de**  
**infecção múltipla**

Tipagem		N <sup>o</sup> de casos
PCR tipo-específica	Sequenciamento	
33	múltiplos tipos	8
16	múltiplos tipos	3
31	múltiplos tipos	3
35	múltiplos tipos	2
11	múltiplos tipos	1
33	62/X	1
16 e 35	múltiplos tipos	3
16, 31 e 33	múltiplos tipos	3
16 e 18	múltiplos tipos	1
16 e 31	múltiplos tipos	1
16, 31, 33 e 35	múltiplos tipos	1
16, 33 e 35	múltiplos tipos	1
31 e 33	múltiplos tipos	1
31 e 35	múltiplos tipos	1
6, 16, 33 e 35	múltiplos tipos	1
6, 18 e 33	múltiplos tipos	1
X	múltiplos tipos	33
X	52 e 67	1
X	62/X	1
31 e 33	31	2
16 e 18	16	1
16 e 33	16	1
16, 33 e 35	16	1
18 e 33	18	1
18, 31 e 33	18	1

X = Tipo não identificado

**TABELA 10**  
**Casos com resultado de tipagem diferente entre PCR tipo-específica e sequenciamento**

Tipo Identificado		
PCR Tipo-específico	Sequenciamento	Nº de casos
33	58	4
33	67	4
33	62	1
33	56 e 58	1
35	54	1
35	JEB2	1



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Genotipagem do HPV

Os exames moleculares podem identificar os diferentes tipos de HPVs (de baixo e alto risco oncogênico) presentes em células obtidas durante a triagem citológica de rotina. Por sua alta sensibilidade, têm sido foco de interesse de muitos estudos, devido à importância da identificação dos tipos virais infectantes, principalmente os oncogênicos. Para isso, foram desenvolvidos vários métodos, e muitas estratégias têm sido propostas para a genotipagem do HPV, sendo a PCR um dos métodos mais sensíveis, e por isso, mais utilizados em estudos clínicos e epidemiológicos (CARMO, FIORINI, 2007; GRAVITT et al, 2000; HUBBARD, 2003; JOHNSON et al, 2003; KOSEL et al, 2003; MOLIJN et al, 2005; MOYA et al, 2006; NELSON et al, 2000). Neste estudo, foi comparada a eficácia de dois métodos de genotipagem: PCR tipo-específica e sequenciamento direto do produto amplificado.

Para detecção do HPV e sequenciamento foram empregados os iniciadores MY09/11 (MY) e GP5+/6+ (GP), os quais têm sido usados universalmente desde a década de 1990 e apresentam a vantagem de identificar um grande número de tipos de HPVs, inclusive tipos desconhecidos, sendo por isso considerados padrão de referência em vários estudos (BALERIOLA et al, 2008; FONTAINE et al, 2007). Segundo Pannier-Stockman et al (2008), o uso de MY/GP em sistema de *nested* PCR pode detectar 57 tipos de HPV mucosotrópicos.

Os diferentes tipos de HPVs, contudo, podem não ser detectados de acordo com os iniciadores utilizados; o emprego de MY/GP em sistema de *nested* PCR foi proposto como forma de diminuir essa limitação, além de aumentar a sensibilidade de detecção, com taxa de positividade 39% maior do que o emprego isolado do MY, sendo capaz de detectar os HPVs em amostras contendo baixo número de cópias de DNA do HPV (PANNIER-STOCKMAN et al, 2008). Em nosso estudo, em que se usou a estratégia MY/GP, conseguiu-se amplificação para os tipos HPV 90 e HPV *cand86*, os quais, segundo Terai e Burk (2002), não são reconhecidos com o sistema MY isoladamente. Speich et al (2004), comparando o resultado da genotipagem com os iniciadores MY e GP isoladamente, verificaram que o MY

falhou em amplificar os tipos 30, 42, 43, 51, 59, 67, 74, 92 e 91 e o GP não amplificou os tipos 61 e 62; neste estudo, foram amplificados os tipos 59, 67, 90, 61 e 62, sendo o tipo 62 o sexto mais prevalente.

Segundo Kosel et al (2003), em infecções múltiplas a *nested* PCR pode ser mais seletiva para um dos tipos de HPVs presentes em infecções múltiplas, seja devido à alta quantidade viral, seja por maior eficiência de amplificação de um dos vírus. Tal fato pode levar à subestimação da prevalência de certos tipos virais em infecções múltiplas. O mesmo foi também observado por autores que utilizaram o sequenciamento com os iniciadores GP5+/GP6+ (HUANG et al, 2004; JACOBS et al, 1999; QU et al, 1997). Apesar dessa limitação, o emprego de MY/GP continua sendo uma das abordagens mais utilizadas tanto em pesquisas epidemiológicas quanto em estudos clínicos (EVANDER et al, 1992; GIOVANNELLI et al, 2004; HUSNJAK et al, 2000; JOHNSON et al, 2003; NELSON et al, 2000; SOTLAR et al, 2004; STRAUSS et al, 1999).

Para genotipagem por PCR tipo-específica, foram utilizados iniciadores desenhados a partir de regiões altamente variáveis do HPV, como as regiões E6 e E7, especialmente para os HPVs de alto risco, possibilitando a amplificação específica dos tipos pesquisados (GRCE et AL, 2001; HUSNJAK et al, 2000).

Por meio dos métodos empregados neste estudo (PCR tipo-específica e sequenciamento), foi possível identificar o tipo, ou pelo menos um dos tipos, em 87% (227/260) dos casos estudados. Foram identificados 33 tipos virais e dois tipos ainda não classificados taxonomicamente, o isolado JEB e o tipo JEB2, totalizando 35 sequências virais, sendo 16 classificadas como de alto risco oncogênico segundo de Villiers et al (2004); dois desses tipos, HPV 67 e HPV 70, não estão incluídos no coquetel pesquisado pelo teste HC2, o que fortalece o uso da PCR e do sequenciamento como ferramentas importantes em fornecer informações relevantes sobre a infecção do HPV nas pacientes.

Considerando ambas as técnicas, o HPV 16 (12,4%) foi o tipo viral mais frequente, seguido pelo HPV 33 (11,3%) e HPV 6 (8%). Estes achados contrastam um pouco com resultados encontrados por outros autores que também estudaram a

prevalência do HPV em mulheres brasileiras infectadas pelo HIV. Corrêa (2007), Zimmermann (2002) e Souza et al (2001) encontraram o HPV 6 e 16 como mais prevalentes; Cerqueira et al (2007), os tipos 16, 81, 52 e 35; Levi et al (2002) encontrou os tipos 6, 51, 11 e 18, sendo que este mesmo autor publicou resultados discordantes em uma coorte semelhante, em que encontrou os tipos 16, 52, 59 e 68 como os mais prevalentes em HIV-positivas e o tipo 51 em HIV-negativas (LEVI et al, 2004). Estudos realizados nos EUA que também avaliaram a prevalência do HPV em mulheres HIV-positivas encontraram os tipos 53, 16 e 18 (SUN et al, 1995) e os tipos 53, 61 e 58 (PALEFSKY et al, 1999).

Estudo de meta-análise que analisou a distribuição dos tipos de HPV em mulheres HIV-positivas revelou que os cinco tipos mais prevalentes em todo o mundo são 53, 16, 61, 58 e 83; nas Américas do Sul e Central, especificamente, os tipos 16, 68, 53, 18 e 52, nesta ordem (CLIFFORD et al, 2006a). De forma geral, estes achados têm mostrado grande variabilidade dos tipos de HPVs nesse grupo de mulheres, o que em parte pode ser devido ao fato de que quando se utilizam métodos de genotipagem distintos podem-se produzir resultados diferentes de acordo com a sensibilidade e a especificidade dos métodos empregados, bem como o espectro de detecção dos diferentes tipos de HPV (CAPRA et al, 2008; LEVI et al, 2004).

Muitos estudos envolvendo mulheres infectadas pelo HIV mostraram existir forte relação entre HIV, HPV e neoplasia intra-epitelial cervical; além de apresentarem maior prevalência da infecção pelo HPV, mulheres HIV-positivas estão infectadas principalmente por tipos oncogênicos do HPV (CAMPOS et al, 2005; CERQUEIRA et al, 2007; FERENCZY et al, 2003; LUQUE et al, 2006; PALEFSKY et al, 1999), fato também observado nesta investigação, em que os tipos oncogênicos tiveram frequência global de 63%.

Nos casos de infecção por múltiplos tipos, observou-se neste estudo a predominância dos tipos de alto risco, enquanto nas infecções simples houve distribuição homogênea entre os tipos de baixo e de alto risco, achado que está de acordo com outros trabalhos (CAMPOS et al, 2005; CORRÊA, 2007).

As infecções múltiplas são um fenômeno comum em mulheres infectadas pelo HIV, o que pode ser explicado pela maior exposição delas a relações sexuais desprotegidas e à falha no sistema imunológico, de forma a permitir a replicação de mais tipos de HPV (PALEFSKY et al, 1999). Neste estudo, na maioria dos casos analisados (67%, 174/260) foi identificado apenas um tipo viral; em 33% (86/260), havia mais de um tipo, caracterizando infecção múltipla. Essa frequência de infecções múltiplas é um pouco menor quando comparada com outros estudos brasileiros que avaliaram a prevalência do HPV em mulheres HIV-positivas: Gonçalves et al (1999) e Levi et al (2004) encontraram 45%, Campos et al (2005) 50%, Corrêa (2007) 64,8%. Nos EUA, Luque et al (2006) encontraram 52%, Palefsky et al (1999) 36% e Ellerbrock (2000) 12% de infecções múltiplas pelo HPV em mulheres infectadas pelo HIV.

Em estudo semelhante ao presente, Vernon et al (2000), comparando o sequenciamento com o método *Line Blotting* (Roche Molecular Systems), que possui sondas específicas para 27 tipos de HPV, em amostras de mulheres africanas infectadas pelo HIV e/ou com DSTs, também relatou menor frequência de infecções múltiplas identificadas por meio do sequenciamento (17%).

A baixa frequência de infecções múltiplas encontradas no presente trabalho pode ser devida ao fato de que a PCR com os iniciadores MY09/11 e GP5+/6+, como já comentado, em amostras contendo múltiplos genótipos, pode amplificar preferencialmente alguns tipos virais e subestimar a frequência das infecções múltiplas (JACOBS et al, 1999; KOSEL et al, 2003; VERNON et al, 2000).

## **6.2 Comparação dos métodos PCR tipo-específica e sequenciamento**

Por meio da PCR tipo-específica para os 7 genótipos pesquisados (6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35), foi possível identificar os tipos ou pelo menos um deles em 94/260 (36%) dos casos. Em estudo realizado em pacientes com anormalidades citológicas, Grce et al (2001), por meio de PCR tipo-específica para 6 tipos (6, 11, 16, 18, 31 e 33) conseguiu tipar 51% dos casos. Em nosso estudo, a tipagem pela PCR tipo-específica não foi possível na maioria dos casos (64%), o que pode ser atribuído em parte à grande variabilidade de tipos presentes nessas pacientes.

A escolha dos 7 tipos pesquisados em nosso estudo deveu-se ao fato dos tipos 6 e 11, de baixo risco, serem mais prevalentes e encontrados em até 95% dos condilomas acuminados (GROSS, BARRASSO, 1999), e os tipos oncogênicos 16, 18, 31, 33 e 35 estarem entre os oito mais prevalentes nos casos de câncer cervical em todo o mundo (CLIFFORD et al, 2006b), portanto de maior importância clínica.

A PCR tipo-específica conseguiu identificar os tipos presentes em 21/86 (24%) casos de infecção por múltiplos tipos, o que representa vantagem desse método. No entanto, o mesmo requer a realização de várias reações para cada amostra, mostrando-se mais demorada e dispendiosa na rotina laboratorial. Tal fato foi também observado por Lin et al (2008) em estudo comparativo com o *kit* comercial *EasyChip HPV Blot* e a PCR tipo-específica para 20 tipos diferentes, que demonstrou maior sensibilidade da PCR tipo-específica. Nesse sentido, o *HPV Blot* falhou em identificar mais de um tipo viral em infecções múltiplas, destacando como vantagem da PCR tipo-específica a identificação dos genótipos em infecções múltiplas, embora com a desvantagem a realização de várias reações de PCR, além da necessidade de se pesquisar um grande número de tipos de HPV para que se consiga identificar os tipos nas infecções múltiplas, tornando esta estratégia pouco viável para estudos em larga escala.

Devido ao maior espectro de detecção, o sequenciamento identificou o tipo viral em maior número de casos (75%, 196/260), além de ter reconhecido 28 tipos de HPV que não estavam no painel pesquisado pela PCR tipo-específica. No entanto, apresentou a desvantagem de não identificar os tipos nos casos de infecções múltiplas, em que as sequências genômicas dos vírus ficam sobrepostas, não possibilitando a distinção dos tipos presentes, o que é também relatado por outros autores (CHOI et al, 2005; JOHNSON et al, 2003; SERRANO et al, 2003; VERNON et al, 2000). Neste estudo, por meio do sequenciamento, conseguiu-se distinguir os tipos presentes em apenas quatro casos de infecção com mais de um tipo viral, o que só foi possível quando havia apenas dois tipos virais na amostra, permanecendo 25% (64/260) dos casos sem tipagem definida.

Pannier-Stockman et al (2008), que aplicou a estratégia MY/GP seguida de sequenciamento em amostras de raspado cervical de pacientes HPV-positivas com

e sem anormalidades citológicas, conseguiu identificar o tipo viral em 97,9% dos casos, sendo identificados 34 tipos virais diferentes. Assim, acredita-se que o uso do sequenciamento na prática clínica para tipagem do HPV em mulheres HIV-negativas mas com anormalidades citológicas poderia aumentar a eficácia de tipagem viral, uma vez que estas mulheres apresentam frequência menor de infecção por múltiplos tipos.

Comparando as duas metodologias e considerando apenas os sete tipos pesquisados pela PCR tipo-específica, nos casos de infecção simples observou-se que o sequenciamento apresentou sensibilidade um pouco maior na identificação dos tipos HPV 6, 16, 18, 31 e 35. Este fato pode estar relacionado ao uso da estratégia MY/GP, que, segundo Pannier-Stockman (2008), é mais sensível e permite a detecção do HPV em amostras contendo pequena quantidade do vírus, o que pode ter limitado a amplificação desses tipos por meio da PCR tipo-específica.

No presente estudo, houve resultados discordantes entre as duas metodologias em 19 casos. Em 10 deles, a PCR tipo-específica identificou o tipo 33 e o sequenciamento, os tipos 58 (4 casos), tipo 67 (4 casos), tipo 62 (1 caso), tipos 56/58 (1 caso); em 2 casos em que a PCR tipo-específica identificou o tipo 35, o sequenciamento indicou o tipo 54 (1 caso) e o tipo JEB2 (1 caso); em 7 casos, o sequenciamento identificou apenas um dos tipos virais presentes na amostra, enquanto que a PCR tipo-específica revelou mais de um tipo. Tais discordâncias podem ser atribuídas ao favorecimento da amplificação de um dos tipos quando existe mais de um tipo viral na reação de PCR, em que é amplificado somente um ou poucos tipos que se encontram em maior quantidade na amostra analisada.

Fato semelhante foi também relatado por outros autores que utilizaram o sequenciamento. Comparando o sequenciamento com a técnica DNA *Chip* (n=282), Choi et al (2005) encontraram 16 casos com tipagem diferente, sendo que, em 7 casos, o tipo identificado pelo sequenciamento estava presente no *pool* de sondas do *Chip*, casos estes considerados como infecção múltipla; em 9 casos, os tipos identificados pelo sequenciamento estavam ausentes no *Chip*, o que pode ser atribuído a hibridação com tipos semelhantes. Disso resulta que mais estudos são necessários para explicar estas diferenças. Kado et al (2001), comparando os

resultados da tipagem por meio de sequenciamento (n=107) a partir da amplificação com cinco diferentes iniciadores (GP17/18, MY09/11, L1C1/L1C2+L1C2M, pU1M-L/pU-2R e pU1M-L/pU-2R-N), encontraram resultados de tipagem diferentes em 5 casos, nos quais foi considerado haver infecção múltipla, e que os diferentes tipos de HPV foram amplificados preferencialmente dependendo do iniciador usado.

A principal vantagem do sequenciamento é que o método permitiu identificar uma grande variedade de genótipos, incluindo tipos menos comuns ou raros. Neste estudo, foram identificados dois tipos ainda não classificados taxonomicamente: o isolado JEB (5 casos) e o JEB2 (2 casos). Segundo consta no banco de dados do NCBI, o isolado JEB foi identificado pela primeira vez em 2007 (referência no GeneBank [EU256380](#)), e o tipo JEB2, em 2004 (referência do GeneBank [AY573931](#)). Até o momento, não encontramos nenhuma publicação referente a esses tipos. Como já relatado por outros autores (FONTAINE et al, 2007; SERRANO et al, 2003) e apesar das limitações, o sequenciamento tem sido considerado como padrão-ouro para genotipagem do HPV, pela possibilidade de identificar praticamente todos os tipos de HPV sem produzir classificações errôneas por reação cruzada entre tipos semelhantes, fenômeno que pode ocorrer em metodologias que têm como base a hibridação.

Nosso estudo comparativo mostrou que o sequenciamento foi mais eficaz em reconhecer os tipos de HPVs, tendo identificado 4,2 vezes mais casos do que a PCR tipo-específica para os sete tipos pesquisados. No entanto, ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, sendo o melhor resultado observado com a combinação dos dois métodos.

### **6.3 Avaliação da estratégia a ser empregada na prática clínica**

Com base nos resultados deste estudo, considera-se como melhor estratégia para genotipar o HPV em amostras clínicas, embora de mais alto custo, a combinação das duas metodologias (sequenciamento e PCR tipo-específica), pois os dois métodos se mostraram complementares. Como o sequenciamento possui maior espectro de detecção, embora não consiga identificar as infecções múltiplas, recomenda-se iniciar a genotipagem pelo sequenciamento e, posteriormente, nos

casos de infecção por múltiplos tipos (em que se detectou sobreposição de sequências virais), realizar a PCR tipo-específica. Para esta, propomos aumentar o painel de tipos a serem pesquisados, incluindo além dos 7 tipos pesquisados, os tipos 45, 52, 56 e 58, por serem tipos oncogênicos prevalentes e de maior relevância clínica; com essa estratégia, espera-se identificar maior número de casos de infecção múltipla.

Abordagens semelhantes a que propomos têm sido adotadas por outros pesquisadores com resultados promissores. Fontaine et al (2007), compararam a técnica de sequenciamento direto seguida de PCR tipo-específica para os tipos 16, 18, 31 e 52 com *kits* comerciais (HC2 e INNO-LiPA), tendo observado alta concordância entre a estratégia de sequenciamento seguida pela PCR tipo-específica e o teste INNO-LiPA, ressaltando algumas vantagens deste, como a identificação dos tipos em infecções múltiplas e menor tempo de trabalho. O sequenciamento permitiu a identificação de amplo espectro de tipos de HPV, inclusive alguns menos comuns; em combinação com a PCR tipo-específica para os tipos 16, 18, 31 e 52, que são mais prevalentes na população estudada, conseguiu-se alcançar alta eficiência de tipagem.

Estudo realizado por Capra et al (2008), em que se aplicou a estratégia MY/GP seguida de sequenciamento em amostras de mulheres com anormalidades citológicas, conseguiu-se tipagem em 70% dos casos, em 30% deles de infecção por múltiplos tipos, sendo nestes casos realizado o teste *INNO-LiPA HPV Genotyping* (Innogenetics), baseado em sondas específicas para 34 tipos de HPV; com essa metodologia, aumentou-se a taxa de tipagem para 88,5%.

Feoli-Fonseca et al (2001), aplicando a estratégia de *nested* PCR usando os iniciadores GP5+/6+ e My09/11 seguida de sequenciamento direto do produto amplificado, observou alta sensibilidade de detecção e melhor relação custo/benefício em relação às outras metodologias, uma vez que o sequenciamento apresenta amplo espectro de identificação viral e permite a tipagem sem resultados equivocados, como as reações cruzadas que podem ocorrer entre tipos semelhantes quando se utilizam-se métodos de hibridação.



Pannier-Stockman et al (2008) concluíram que a estratégia MY/GP para detecção do HPV parece ser menos onerosa do que a aplicação do teste HC2, incluindo a extração do DNA, e que a estratégia de MY/GP seguida de sequenciamento, apesar de consumir mais tempo e ter custo maior, apresentou melhor custo/benefício.

É fato bem documentado que proporção elevada de mulheres soropositivas para o HIV-1 está co-infectada pelo HPV e, muitas vezes, por genótipos oncogênicos, mesmo em casos em que a avaliação citológica não revela achados anormais (CERQUEIRA et al, 2007). Como nessas pacientes imunossuprimidas as lesões têm evolução mais grave do que nas imunocompetentes, sendo lesões de difícil tratamento e alta taxa de recorrência (LEVI et al, 2004), o diagnóstico e genotipagem do HPV adquire importância ainda maior. Além de classificar as pacientes HPV-positivas de acordo com o risco relativo de progressão para câncer cervical, a genotipagem permite identificar infecções persistentes por HPVs de alto risco e avaliar a eficácia e impacto epidemiológico dos programas de vacinação.

Os presentes achados, juntamente com trabalhos de outros autores (CAPRA et al, 2008; CHOW et al, 2000; FONTAINE et al, 2007; PANNIER-STOCKMAN et al, 2008), justificam a utilidade da PCR com iniciadores genéricos seguida de sequenciamento para análise do DNA-HPV, considerando a extensiva heterogeneidade dos tipos de HPV, os quais variam segundo suas atividades biológicas e subsequente risco carcinogênico. Além disso, a genotipagem tem implicações óbvias para o desenvolvimento e monitoramento de estratégias de vacinas anti-HPV.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

1. Os tipos mais prevalentes nas amostras analisadas foram HPV 16, 33, 6, 35, 31 e 62.
2. Por seu amplo espectro de detecção, o sequenciamento foi mais eficaz na identificação dos tipos do HPV, tendo 4,2 vezes mais chances de identificar o tipo viral do que a PCR tipo-específica. No entanto, o método não possibilita a identificação dos genótipos nas infecções múltiplas.
3. A PCR tipo-específica permitiu a identificação dos tipos virais em casos de infecção por múltiplos tipos, complementando a limitação do sequenciamento. Sua limitação é o fato de não permitir reconhecer tipos virais diferentes dos 7 incluídos no estudo.
4. A partir dos tipos identificados pelo sequenciamento (de maior frequência e relevância clínica), pode-se aumentar o número de tipos pesquisados pela PCR tipo-específica, visando identificar os tipos presentes em maior número de casos de infecção múltipla. Para essa finalidade, são indicados os tipos 45, 52, 56 e 58, que foram prevalentes na amostra analisada e são tipos oncogênicos do vírus, tendo, portanto, maior importância na prática clínica.
5. A maior eficácia na genotipagem dependeu da realização dos dois métodos, razão pela qual propõe-se a aplicação conjunta dos dois métodos na prática clínica, iniciando-se a genotipagem pelo sequenciamento.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Automated DNA sequencing – Chemistry guid**, cap.3, p. 34-35, 1998.

ARNDT, O. et al. Das inverte papillom und seine assoziation mit dem humanen papillomavirus (HPV). **Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde**, v. 42, p. 670-676, 1994.

ASATO, T. et al. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing based genotyping. **The Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 1829-1832, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520: informação e documentação: citações em documentos**: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos**: apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: referências**: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6024: numeração progressiva das secções de um documento escrito**: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6027: informação e documentação: sumário**: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NOMAS TÉCNICAS. **NBR 6028: informação e documentação: resumo**: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6029: informação e documentação: livro e folhetos**: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASTORI, G. et al. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. **Virus Research**, v. 50, p. 57-63, 1997.

BALERIOLA, C. et al. Comparison of a novel HPV test with the Hybrid Capture II (hcII) and a reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high-risk human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 1, p. 22-26, 2008.

BERNARD, H-U. et al. Identification and assessment of known and novel papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1077-1085, 1994.

BERTELSEN, B. I. et al. HPV subtypes in cervical cancer biopsies between 1930 and 2004: detection using general primers pair PCR and sequencing. **Virchows Archiv**, 2006.

BEZERRA, S. J. S. et al. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, n. 2, p. 143-148, 2005.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, p. 244-265, 2002.

BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n 11, p. 796-802, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA) Estimativa 2008. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 12 de março de 2008.

BRENNA, S. M. F.; SYRJANEN, K. J. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV) - associated cervical carcinogenesis. **São Paulo Medical Journal**, v. 121, n. 3, p. 128-132, 2003.

CAMPOS, R. R. et al. Prevalência do papilomavirus humano e seus genótipos em mulheres portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 27, n. 5, p. 248-256, 2005.

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

CARESTIATO, F. N. et al. Analysis of molecular biology techniques for the diagnosis of human papillomavirus infection and cervical cancer prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 428-432, 2006.

CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. **I Consenso brasileiro de HPV**. BG Cultural, 2000. 142p.

CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. **Sabios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.

CASTLE, P. E. et al. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. **Journal of Medical Virology**, v. 68, p. 417-423, 2002.

CERQUEIRA, D. M. et al. Caracterização molecular do papilomavirus humano em mulheres infectadas com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 no Distrito Federal e Entorno. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 18, n. 4, p. 267-278, 2007.

CHAN, P. K. S. et al. Biases in human papillomavirus genotype prevalence assessment associated with commonly used consensus primers. **International Journal of cancer**, v. 118, p. 243-245, 2006.

CHAN, S-Y. et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 3074-3083, 1995.

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

CHOW, V. T. K. et al. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. **Pathology**, v. 32, p. 204-208, 2000.

CLIFFORD, G. et al. Human papillomavirus types among infected with HIV: a meta-analysis. **AIDS**, v. 20, p. 2337-2344, 2006a.

CLIFFORD, G. et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 26-34, 2006b.

CORRÊA, C. M. **Prevalência e multiplicidade do papilomavirus humano (HPV) na cérvix uterina de mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em estudo multicêntrico**. 2007.148f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).

COUILLÉE, F. et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 902-907, 2002.

COX, T.; CUZICK, J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. **Gynecologic Oncology**, v.103, p. 8-11, 2006.

DAMIN, D. C. et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 35, n. 5, p. 569-574, 2007.

DEPUYDT, C. E. et al. Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 4, p. 881-891, 2007.

DERCHAIN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 6, p. 281-284, 2007.

de RODA HUSMAN, A-M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057-1062, 1995.

de VILLIERS, E-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

de VILLIERS, E-M. et al. Papillomavirus and typing. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 199-206, 1997.

DIDELOT-ROSSEAU, M-N. et al. Comparison of INNO-LiPA HPV genotyping v2 with PCR product subcloning and sequencing for identification of genital human papillomavirus genotypes in Africa women. **Journal of Virological Methods**, v. 135, p. 181-185, 2006.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

DUGGAN, M. A. et al. A paired Comparison of dot blot hybridization and PCR amplification for HPV testing of cervical scrapes interpreted as CIN 1. **European Journal of Gynecologic Oncology**, v. 15, n. 3, p.178-187, 1994.

ELLERBROCK, T. V. et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. **The Journal of the American Medical Association**, v. 238, n. 8, p. 1031-1037, 2000.

ELUF-NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 114-119, 1994.

EVANDER, M. et al. Comparison of one-step and two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 987-992, 1992.

FEOLI-FONSECA, J. C. et al. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. **Journal of Medical Virology**, v. 63, p. 284-292, 2001.

FEOLI-FONSECA, J. C. et al. A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detection and typing human papillomavirus in pathological specimens. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 7, n. 6, p. 317-323, 1998.

FERENCZY, A. et al. Human papillomavirus and HIV coinfection and risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. **Canadian Medical Association of its licensors**, v. 169, n. 5, p. 431-434, 2003.

FONTAINE, V. et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 928-934, 2007.

FREITAS, T. P. et al. Molecular detection of HPV 16 and 18 in cervical samples of patients from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 297-301, 2007.

FUJINAGA, Y. et al. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 1039-1044, 1991.

GHARIZADEH, B. et al. Type-specific multiple sequencing primers, a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomavirus by pyrosequencing technology. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 2, p. 198-205, 2005.

GHARIZADEH, B. et al. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 5, p. 673-679, 2001.

GIOVANNELLI, L. et al. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: Analysis of the new PGMY-PCR compared to Hybrid Capture II and MY-PCR assay and two-step nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3861-3864, 2004.

GONÇALVES, M. A. G. et al. Relationship between human papillomavirus (HPV) genotyping and genital neoplasia in HIV-positive patients of Santos city, São Paulo, Brazil. **International Journal of DST & AIDS**, v. 10, p. 803-807, 1999.

GRAVITTI, P. E., et al. Improved Amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

GRCE, M. et al. Evaluation of genital human papillomavirus infection by polymerase chain reaction among Croatian women. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1B, p. 579-584, 2001.

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

GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Infecção por papilomavirus humano: Atlas clínico de HPV**. ARTMED, 1999. 432p.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARNISH, D. G. et al. Evaluation of human papillomavirus-consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, p. 9-21, 1999.



HAWS, A. L. F. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 87-93, 2004.

HSING, A. W. et al. Interlaboratory agreement in a polymerase chain reaction-based human papillomavirus DNA assay. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 5, p. 483-484, 1996.

HUANG, L-W. et al. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improve DNA detection and typing in archival tissues. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 271-276, 2004.

HUBBARD, R. A. Human papillomavirus testing methods. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 940-945, 2003.

HUSNJAK, K. et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 88, p. 125-134, 2000.

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

JACOBS, M. V. et al. A general primer GP5+/GP6+ mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 791-795, 1997.

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

JOHNSON, T. et al. Routine genotyping of human papillomavirus samples in Denmark. **Acta Pathologica, Microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, p. 398-404, 2003.

KADO, S. et al. Detection of human papillomavirus in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. **Gynecologic Oncology**, v. 81, p. 47-52, 2001.

KANODIA, S. et al. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, 1996.

KIN, H-J; SONG, E-S; HWANG, T-S. Higher incidence of p53 mutation in cervical carcinomas with intermediated-risk infection. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 98, p. 213-218, 2001.

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

KLETER, B. et al. Novel short-fragment PCR assay for high sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. **American Journal of pathology**, v. 153, n. 6, p. 1731-1739, 1998.

KOIDL, C. et al. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 199, n. 2, p. 144. e1-6, 2008.

KORNEGAY, J. et al. International proficiency study of a consensus LI PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: Evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1080-1086, 2003.

KOSEL, S. et al. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting – improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridisation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 6, p. 787-791, 2003.

LEE, G-Y. et al. Human papillomavirus (HPV) genotyping by HPV DNA chip in cervical cancer and precancerous lesions. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.15, p. 81-87, 2005.

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

LEVI, J. E. et al. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, p. 225-231, 2004.

LEVI, J. E. et al. High presence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in Human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.

LIN, C-Y. et al. Human Papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 361-367, 2008.

LIN, C-Y. et al. Quality assurance of genotyping array for detection and typing of human papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 1-9, 2007.

LORENZATO, F. et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 10, p. 143-150, 2000.

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

MANOS, M. M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p.209-214, 1989.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of Human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 15-33, 2001.

MEIJER, C. J.; SNIJDERS, P. J.; CASTLE, P. E. Clinical utility of HPV genotyping. **Gynecologic Oncology**, v. 103, p. 12-17, 2006.

MÉNDEZ, F et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 1158-1165, 2005.

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

MONTALDO, C. et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, p. 482-487, 2007.

MOYA, A. S. et al. Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma humano en muestras genitales. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 161-166, 2006.

MUNOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. 3-10, 2006.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n. 6, p. 518-257, 2003.

MUNOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **Journal of Clinical Virology**, v. 19, p. 1-5, 2000.

MURTA, E. F. C. Vacina contra o HPV ou contra o câncer de colo uterino? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 10, p. 548, 2007.

NADAL, L. R. M.; NADAL, S. R. Indicações da vacina contra o papilomavirus humano. **Revista Brasileira de coloproctologia**, v. 28, n. 1, p. 124-126, 2008.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C. R. Vacinas contra o papilomavirus humano. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 3, p. 337-340, 2006.

NAMKOONG, S. E. Clinical Application of HPV typing in cervical cancer. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, suppl. 49, p. 59-67, 1995.

NELSON, J. H. et al. A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomavirus in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 688-695, 2000.

NOBBENHUIS, M. A. E. et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. **Lancet**, v. 354, p. 20-25, 1999.

OLIVEIRA, L. H. S.; ROSA, M. L. G.; CAVALCANTI, S. M. B. Patterns of genotypes distribution in multiple human papillomavirus infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 60-65, 2008.

ORTIZ, M. et al. Oncogenic human papillomavirus (HPV) type distribution and HPV type 16 E6 variants in two Spanish population groups with different levels of HPV infection risk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1428-1434, 2006.

PAGANO, M; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. Tradução da 2ª edição norte americana: Thompson Pioneira, 2004. 506p.

PALEFSKY, J. M. et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk (HIV)-negative women. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, n. 3, p. 226-236, 1999.

PANNIER-STOCKMAN, C. et al. Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. **Journal of Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 353-360, 2008.

PASSOS, M, R, L. Médico esclarece questões sobre HPV e vacinação: 2º Congresso da Comunidade de Países de Língua Portuguesa sobre DST/AIDS. Rio de Janeiro. **Livro de Resumos**, 2008.

PENNA, S. D. J. et al. Sequence-specific "gene-signature" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 1946-1949, 1994.

PEREIRA, C. R. N. et al. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, p. 651-660, 2007.

PEYTON, C. L. et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **The journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 1554-1564, 2001.

PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240, 2002.

SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 453-459, 2007.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequencing in DNA. **Science**, v. 214, p. 1205-1210, 1981.

SASAGAWA, T. et al. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in japanese women. **Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention**, v. 10, p. 45-52, 2001.

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

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, p. 727-746, 2005.

SERRANO, M. L. et al. Tipificación de virus Del papiloma humano mediante secuencia directa em mujeres com citologia normal. **Revista Colombiana de Cancerología**, v. 7, n. 4, p. 18-24, 2003.

SILVA, T. T. et al. Identificação de tipos de papilomavirus e de outros fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 285-291, 2006.

SMITS, H. L. et al. Detection and typing of human papillomavirus present in fixed and stained archival cervical smears by a consensus polymerase chain reaction and direct sequence analysis allow the identification of a broad spectrum of human papillomavirus types. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 3263-3268, 1992.

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

SOTLAR, K. et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3176-3184, 2004.

SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV<sup>+</sup>: Acuidade da histopatologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

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

STANLEY, M. A. Immunobiology of papillomavirus infections. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p.45-59, 2001.

STOLER, M. H. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 127, p. 935-939, 2003.

STRAUSS, S. et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in paired urine and cervical scrapes. **European Journal of Epidemiology**, v. 15, p. 537-543, 1999.

SUN, X-W. et al. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstetrics & Gynecology**, v. 85, n. 5, p. 680-686, 1995.

SZOSTEK, S. et al. Detection of human papillomavirus in cervical cell specimens by hybrid capture and PCR with different primers. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 603-607, 2006.

TERAI, M.; BURK, R. D. Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: *canHPV89*, *canHPV 90* and *canHPV91*. **The Journal of Infectious Disease**, v. 185, p. 1794-1797, 2002.

THOMISSON III, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology**, v. 39, p. 154-166, 2008.

TONG, S. Y. et al. Human papillomavirus genotype as a prognostic factor in carcinoma of the uterine cervix. **International Journal of Gynecological Cancer**, 2007.

TOZZETI, I. A. et al. Multiple types of human papillomavirus in cervical samples in women in Campo Grande, MS, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 309-310, 2006.

van den BRULE, A. J. C. et al. General primer polymerase chain reaction in combination with sequence analysis for identification of potentially novel human papillomavirus genotypes in cervical lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1716-1721, 1992.

van den BRULE, A. J. C. et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 12, p. 2739-2743, 1990.

VERNON, S. D.; UNGER, E. R.; WILLIAMS, D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 651-655, 2000.

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



VILLA, L. L. et al. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 9, p. 45-48, 1995.

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

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, p. 506-513, 1991.

WRIGHT, T. C. Jr.; RICHART, R. M. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital and cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 37, n. 2, p. 151-164, 1990.

YAMAGUCHI, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA by PCR/microfluometry for screening of cervical cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 41-49, 2002.

YOUNG, L. S. et al. The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigation cervical human papillomavirus infection. **British Medical Journal**, v. 298, p. 14-18, 1989.

ZIMMERMANN, J. B. **Prevalência dos genótipos do papilomavirus humano na cérvix uterina de pacientes infectadas com o vírus da imunodeficiência humana e sua associação com o grau das lesões do colo uterino**. 2002.146f. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).

zur HAUSEN, H. Papillomavirus in anogenital cancer as a model do understand the role of viruses in human cancers. **Cancer Research**, v. 49, n. 1, p. 4677-4681, 1989.

zur HAUSEN, H. Condyloma acuminata and human genital cancer. **Cancer Research**, v. 36, p. 530, 1976.

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEP

**Parecer n.º 085/02**

**Interessado: Prof. Victor Hugo de Melo**  
**Depto de Ginecologia e Obstetrícia - FM/UFMG**

**Voto:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 19 de junho de 2002 o projeto de pesquisa intitulado « **Programa multicêntrico para controle e prevenção das lesões cervicais de alto grau e do câncer cérvico-uterino em mulheres portadoras do HIV** » com a recomendação de que o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido seja sintetizado de forma mais simples, evitando dificultar o entendimento dos sujeitos da pesquisa. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco**  
**Presidente do COEP/UFMG**

**Título do projeto: “PROGRAMA MULTICÊNTRICO PARA CONTROLE E PREVENÇÃO DAS LESÕES CERVICAIS DE ALTO RISCO E DO CÂNCER CERVICO-UTERINO EM MULHERES PORTADORAS DO HIV.”**

Está sendo feito um estudo no estado de Minas Gerais com as mulheres portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) para detectar lesões que levam ao câncer no colo uterino destas mulheres. Este estudo está sendo patrocinado pelo Ministério da Saúde – Secretaria de Políticas de Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS. O Dr. Victor Hugo de Melo é o coordenador desta pesquisa na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Estado de Minas Gerais. Você está sendo convidada a participar deste estudo. Antes de decidir pela sua participação queremos informá-la sobre este estudo através deste termo de consentimento. Você poderá fazer perguntas a qualquer momento. Se você decidir entrar no estudo, será solicitado que assine este termo de consentimento.

**POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença que destrói o sistema imunológico do organismo (defesas do organismo para combater as infecções), deixando uma pessoa incapaz de lutar contra doenças que ameaçam a vida. Pretendemos com este estudo obter informações sobre a associação que existe entre a diminuição das defesas do organismo a presença do papilomavírus humano (HPV), outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), levando a lesões pré-cancerosas e cancerosas no colo uterino das mulheres portadoras do HIV. Estas informações serão usadas para melhorar o acompanhamento e tratamento das lesões no colo uterino, prevenindo o câncer, porque a grande maioria das mulheres portadoras do HIV (mais de 80%) são portadoras do HPV (vírus que pode causar o câncer no colo uterino). Os procedimentos realizados neste estudo são os mesmos que você receberia caso opte por não participar dele.

**O QUE EU PRECISO FAZER NAS VISITAS DO ESTUDO?**

Se você decidir participar neste estudo, serão colhidas informações sobre a sua saúde e relacionadas a ela em todas as suas consultas.

**QUE EXAMES E ANÁLISES DE LABORATÓRIO SERÃO FEITOS NAS VISITAS DO ESTUDO?**

Será realizado um exame ginecológico completo com coleta de material para citologia oncológica (igual à realizada anualmente para prevenção do câncer do colo uterino em qualquer mulher), coleta de material para PCR para HPV (feita com a mesma espátula usada para colher a citologia oncológica). Necessitaremos que você faça exames de sangue que ajudarão o seu médico a acompanhar como agem as defesas do seu corpo para auxiliar na resposta ao tratamento ginecológico que se fizer necessário para a sua cura ou um melhor controle da lesão pré-cancerosa. Para a realização destes procedimentos descritos aqui, poderá ser necessário que você compareça em mais de uma consulta.

## **QUANTAS MULHERES PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO E DURANTE QUANTO TEMPO?**

Estima-se a participação de aproximadamente 550 mulheres de diferentes cidades do Estado de Minas Gerais que farão parte neste estudo.

## **QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?**

Os riscos são muito pequenos. Não há riscos importantes na coleta do material para prevenção do câncer do colo uterino, apenas um leve desconforto ou uma cólica leve. Quando houver necessidade de biópsia no colo uterino você poderá sentir uma cólica leve, raramente poderá ocorrer sangramento aumentado e/ou desmaio. Caso necessite de cauterização química ou de eletro-cauterização poderá sentir um pouco de dor em cólicas que será minimizada, dependendo da região a ser tratada, com anestésicos locais. Como em todo procedimento médico existe a possibilidade de insucesso no diagnóstico e tratamento destas lesões. Sabe-se que nas mulheres portadoras do HIV a porcentagem de recidiva (retorno) das lesões do colo uterino é maior do que nas mulheres não portadoras do HIV. Mas, todos os esforços serão feitos no sentido de minimizar as complicações decorrentes desta condição.

## **HÁ BENEFÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?**

Sim. Para você, de imediato: terá a possibilidade de diagnóstico e tratamento de suas lesões no colo uterino, mas é bom lembrar que é o mesmo que você teria se optasse por não participar do estudo ou se desejar desistir de sua participação neste estudo. Para os médicos: as informações obtidas neste estudo poderão ajudá-los a descobrir mais sobre as lesões pré-cancerosas no colo uterino das mulheres portadoras do HIV. Pretende-se saber se há associação da carga viral (quantidade do vírus - HIV - no corpo) ou a contagem de linfócitos CD4 (são as células da defesa do corpo) determinando a presença ou gravidade destas lesões no colo uterino e infecções como pelo HPV que levam ao câncer. Espera-se que com estes conhecimentos tenhamos mais facilidades no manejo destas pacientes portadoras do HIV, contribuindo para a redução deste câncer cérvico-uterino e melhora na qualidade da vida sexual destas pacientes.

## **CONFIDENCIALIDADE**

Serão feitos esforços no sentido de manter os prontuários médicos confidenciais (privados), embora não se possa garantir absoluta confidencialidade. O seu prontuário médico poderá ser aberto, se exigido por lei. Os resultados dos seus exames serão mantidos em sigilo. Entretanto, esses prontuários poderão ser vistos por indivíduos que trabalham neste estudo e os resultados poderão ser publicados em revistas científicas. Você não será pessoalmente identificada em nenhuma publicação resultante da informação obtida neste estudo.

## **HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?**

Não há nenhum custo para você relacionado com as visitas clínicas, exames ou testes de laboratório em conexão com o estudo.

**EU RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?**

Você não receberá nenhum tipo de remuneração (pagamento) por estar neste estudo. Da mesma forma, não existe nenhuma remuneração para os pesquisadores.

**O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER LESÃO?**

Se você sofrer algum tipo de lesão em consequência deste estudo, o ambulatório ao qual você está sendo acompanhada em qualquer uma das diversas cidades de Minas Gerais (unidades clínicas) envolvidas neste estudo dispensará a você o tratamento necessário e imediato da lesão. Será comunicado onde você poderá receber tratamento adicional das lesões se for o caso. Você terá também apoio adicional no Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias da UFMG/PBH (CTR-DIP). Não existe qualquer programa de pagamento a você, mas você não estará renunciando a nenhum direito legal ao assinar este termo de consentimento.

**QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS POR PARTICIPAR DA PESQUISA?**

Sua participação na pesquisa é completamente voluntária. Você tem o direito de recusar a participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu li este termo de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que eu posso sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

Nome da paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura da paciente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Coordenador do Projeto Professor  
Prof. Dr. Victor Hugo de Melo Cidade  
Belo Horizonte  
Fone: (31)9968-2401/(31)3273-5233

\_\_\_\_\_  
Professor/Médico  
Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG.  
Telefone: (31)3248-9364

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


**Parecer nº. ETIC 06/07**

**Interessado(a): Prof. Geraldo Brasileiro Filho**  
**Departamento de Anatomia Patológica**  
**Faculdade de Medicina-UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 28 de fevereiro de 2007, o projeto de pesquisa intitulado **"Comparação dos métodos de tipagem do HPV por meio de amplificação por PCR usando-se iniciadores alelo-específicos e por sequenciamento direto do produto amplificado"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP-UFMG**

## COMPARISON OF HPV GENOTYPING BY TYPE-SPECIFIC PCR AND SEQUENCING

Nara de Oliveira Carvalho<sup>a</sup>, Dora Méndez Castillo<sup>a</sup>, Carlos Perone<sup>a</sup>, José Nélio Januário<sup>a</sup>, Victor Hugo Melo<sup>b</sup>, Geraldo Brasileiro Filho<sup>c</sup>.

<sup>a</sup>Center for Research and Diagnostics (NUPAD), Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup>Reference and Training Center on Infectious and Parasitic Diseases (CTR-DIP) Orestes Diniz, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Nara de Oliveira Carvalho

Alfredo Balena, 190, room 522. Santa Efigênia – Belo Horizonte – MG – Brazil.

Post code: 30130-100

Tel.:+ 55-31-3409-9706

Fax. +55-31-3409-9724

Email address: [nocarvalho@gmail.com](mailto:nocarvalho@gmail.com)

### ABSTRACT

**Objective:** This study has compared the effectiveness of type-specific PCR (TS-PCR) and sequencing aiming at their clinical application.

**Methods:** Two hundred and sixty cervical samples of HPV-positive patients were studied by TS-PCR for types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35 and by sequencing.

**Results:** Genotype was identified in 36% of cases by TS-PCR and in 75% by sequencing. Sequencing was four times more likely to identify the viral type in positive samples than TS-PCR ( $p=0.00$ ). Despite sequencing being more effective for virus genotyping, this method cannot identify viral types in multiple infections. By combining both techniques has allowed highly sensitive detection (87% of cases), showing that they are complementary methods.

**Conclusions:** Based on these results and in order to genotype clinical samples, we propose to begin by sequencing and, if necessary, in cases of multiple infections, to use TS-PCR. HPV genotyping is an important step in HPV management by allowing selection of patients with a higher risk of developing cervical cancer and contributing to develop type-specific vaccines.

**Keywords:** HPV, PCR, Sequencing, Typing

#### 1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted virus in young and sexually active people of both sexes<sup>1</sup>. Anogenital HPV, which are primarily mucosotropic, are classified as high and low risk, according to their relationship with benign or malignant proliferative lesions<sup>2</sup>.

Based on the viral DNA sequence, more than 230 HPV types are known<sup>3</sup>; 118 genotypes are well-characterized according to biological niche, oncogenic potential and phylogenetic position<sup>2</sup>. About 40 HPV types infect anogenital region, and 15 of them – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82 – are considered oncogenic or as high risk, since they are associated with high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) or cancer. Types 26, 53 and 66 are likely to be carcinogenic, whereas types 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and *condHPV89/Cp6108* are considered as low risk<sup>4</sup>.

HPV are associated to many proliferative lesions, being condyloma acuminatum the most common, and to different types of cancer, including cervical, vaginal, vulvar, penis, anal, oropharyngeal, buccal cavity and larynx<sup>5,6</sup>. Among them, uterine cervix carcinoma is particularly important due to its high incidence and to its high mortality rate. In most cases, tumors evolve slowly and can be prevented by identifying, as early as possible, precursor lesions in the cervical epithelium, allowing effective treatment before local invasion and spread of the disease<sup>7</sup>.

A strong association between HPV and cervical cancer stimulated the development of several diagnostic tests, particularly those based on molecular biology. The two main approaches to molecularly detect HPV are PCR with generic primers which amplify part of L1 gene of the viral capsid,



which is highly conserved among anogenital HPV, and the hybrid capture test (HC2), which detects the main types of HPV, by forming DNA-RNA hybrids<sup>8-10</sup>. As it is more sensitive, PCR has been largely used worldwide<sup>11-13</sup>.

The diversity of virus types and the incidence of multiple infections have made it necessary to develop reliable methods to identify the different genotypes, not only for epidemiological studies as well as for the patients' follow-up<sup>14</sup>. As there is no officially approved test for HPV genotyping<sup>15</sup>, several methods have been used in order to identify different virus types, using PCR with generic primers<sup>11</sup>, RFLP<sup>16</sup>, hybridization with specific probes<sup>17</sup>, reverse hybridization line probe assay – HPV-LiPA<sup>18</sup>, reverse line-blot hybridization<sup>17</sup>, nucleotide sequencing<sup>6,19-21</sup> and DNA Chip<sup>22</sup>. Another approach is PCR with specific primers (TS-PCR) for each virus type, based on polymorphisms, mainly E6 and E7. This is a highly sensitive method, easy to be interpreted and that allows characterizing virus types in cases of multiple infection<sup>8,12,14,19,23</sup>. Selecting virus types to be searched for should be based on epidemiological and prevalence studies, as there is a wide variation in the genotype distribution in different regions around the world.

Over the last few years, virus genotyping has become an important way to approach cervical cancer. An effective genotyping test for HPV has been looked for, due to its great contribution in the diagnosis of infections and to a better understanding of the relationship of HPV with carcinogenesis, in addition to contributing to the development of type-specific vaccines. The present study has the purpose of comparing two methods of HPV genotyping (type-specific PCR and sequencing), aiming to find an effective strategy for virus genotyping in clinical samples.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Study population**

The present study is part of a multicentric research project entitled Multicentric Program for Controlling and Preventing High Degree Cervical Lesions and Cervical Uterine Cancer in HIV-positive Women. Samples came from HIV-infected women attended at Referral and Training Center on Parasitic and Infectious Diseases Orestes Diniz, in Belo Horizonte, or at public gynecology outpatient clinic from other cities (Betim, Barbacena, Divinópolis and Conselheiro Lafaiete), all of them in Minas Gerais state. From February 2006 to February 2008, 463 samples were analyzed; 260 of them were included in this study as they were HPV-positive. The research study has been approved by Research Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais (UFMG), having all participants given a written consent.

### **2.2 Sample collection and processing**

Cervical cells were obtained with an Ayre's spatula, and placed in a sterile tube containing 2mL of physiological saline solution (NaCl, 0.09%) and, within 24 hours, sent to the laboratory.

DNA was extracted using Chelex 100 chelating resin (BioRad), according to manufacturer's protocol<sup>24</sup>. In order to control DNA quality, globin gene was amplified<sup>25</sup> in all samples. PCR was performed in a final volume reaction of 50µL, containing 10µL of DNA, 5µL buffer 10X (100mM Tris-HCl [pH 8,8] 500mM KCl), 3µL MgCl<sub>2</sub>, 1µL dNTPs [200 µM], 2,5µL of each primer at 10pmol/µL and

2.5UI of Taq DNA polymerase. The PCR conditions were: preheating for 1 min at 94°C was followed by 30 cycles of 30 sec at 90°C, 2 min at 54°C, and 1 min at 72°C and a final extension of 10 min at 72°C. Samples globin-negative were excluded from the study. HPV detection by PCR was carried out in a nested-PCR system, using MY09/11<sup>26</sup> and GP5+/6+<sup>27</sup> primers. For the first reaction, the same conditions were used as those for globin gene. Nested-PCR was performed in a final volume of 50µL, containing 1µL of the first reaction, 5µL buffer 10X (100mM Tris-HCl [pH 8.8] 500mM KCl), 3µL MgCl<sub>2</sub>, 1µL dNTPs [200 µM], 2.5µL of each primer at 10pmol/µL and 2.5UI of Taq DNA polymerase. The PCR conditions were: preheating 4 min at 94°C was followed by 40 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at 45°C, and 1min and 30 sec at 72° and the final extension of 10 min at 72°C.

### 2.3 Type-specific PCR (TS-PCR)

DNA was amplified with specific primers for the following HPV types: 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35<sup>25,28</sup> in independent reactions. PCR was performed in a final volume reaction of 50µL, containing 5µL of DNA, 5µL buffer 10X (100mM Tris-HCl [pH 8.8] 500mM KCl), 3µL MgCl<sub>2</sub>, 1µL dNTPs [200 µM], 2.5µL of each primer at 10pmol/µL and 2.5UI of Taq DNA polymerase. Amplification conditions were the same as those for globin gene, except for annealing temperatures, which were the following: for HPV types 16, 31 and 35 – 2 min at 54°C, for HPV type 6 – 2 min at 56°C, for HPV type 11 – 2 min at 61°C, for HPV type 18 – 2 min at 58°C, and for HPV type 33 – 2 min at 50°C. All PCR products were submitted to agarose gel electrophoresis 2%, treated with ethidium bromide and analyzed under UV light. Primers' sequences and size of fragments are shown in Table 1.

### 2.4 Direct sequencing

About 30µL of nested-PCR product of each sample was purified and sequenced using BigDye Terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) and Gp6+ primer (4pmol/µl), according to the manufacturer's instructions. Sequences were read on a 3100-*Avant* Genetic Analyser ABI Prism sequencer (Applied Biosystems). Each sequence obtained was edited, by selecting a segment of 30 nucleotides. The size and location of the L1-amplified region segment were chosen based on the degree of polymorphisms and according to HPV sequencing methods published<sup>20,29</sup>. Sequences of 30 nucleotides were aligned using the Bioedit program (version 7.0)<sup>30</sup> with HPV reference sequences obtained from the ICTVdB database (<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/>). Complementary analysis of sequences obtained from Blast was performed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 2.5 Data analysis

Data were tabulated using Microsoft Office Excel 2007. In order to compare the effectiveness of both methods in identifying the virus type, McNemar statistical test was applied.

## 3. Results

Using the two strategies (TS-PCR and sequencing), HPV genotype was identified in 227 (87%) of the 260 samples. In 33 cases (13%), it was not possible to identify the virus genotype due to the presence of non-identified types in the panel investigated by the TS-PCR and/or to the occurrence

of multiple-type infection, which has not allowed typing by sequencing. In Graphic 1 the frequency of the 35 types identified in the study are shown, with HPV 16 (12.4%), HPV 33 (11.3%) and HPV 6 (8%) being the most frequent ones. Table 2 shows the types identified for each case.

By TS-PCR for the seven types investigated, it was possible to genotype the virus in 94/260 (36%) cases; in 21 of them more than one virus type was identified. With this method, the virus type was not identified in 166/260 (64%) cases, as shown in Graphic 2.

By means of direct sequencing of the amplified product, the virus type was identified in 196/260 (75%) cases; in 123 of them, the types were distinct from those included in the panel surveyed by TS-PCR. The presence of more than one virus type, characterized by overlapping sequences, was seen in 68/260 (26%) cases, making it impossible to identify the types present in the great majority of cases; in only four these cases the types were identified. Therefore, by sequencing 64/260 (25%) cases remained without virus genotyping identification. In addition to the seven types investigated by TS-PCR (types 6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35), 28 other HPV types were identified by sequencing (32, 39, 40, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 62, 61, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 84, 85, 90, 102, *cand86*, *cand89* and two types that still have not been classified taxonomically, the isolated JEB and the type JEB2). These results are shown in Graphic 3.

Regarding multiple infections (n=86), TS-PCR technique has identified more than one virus type in 21/86 (24%) cases; in seven of the cases, sequencing has failed to identify multiple types, recognizing only one of the types present in the sample. By means of sequencing, 68/86 (79%) samples were of multiple infections, and in only 4/86 (4.6%) of them it was possible to identify types or at least one virus type. Considering the results of both techniques together, types or at least one of them were identified in 53/86 (62%) cases of multiple infection. In 12 cases the typing result was different between the two methods employed. In the 19 cases of discordance between TS-PCR and sequencing (7 in which sequencing failed to identify multiple types and 12 in which typing was different in both methods), we considered that more than one virus type was present in the sample, since sequencing may fail to identify multiple types.

Comparing the effectiveness of both methods to identify HPV types present in samples, at the significance level of 95% the number of cases with genotype identified by the sequencing method is higher than that by TS-PCR for the seven types studied ( $p = 0.00$ ). Chances ratio estimated showed that sequencing had 4.2 times more chances to identify the virus type present in positive samples than TS-PCR for the seven types investigated; 133 not identified genotypes by TS-PCR were successfully identified by sequencing and only 33 not identified genotypes by sequencing were identified by TS-PCR (Table 3).

#### 4. Discussion

Molecular tests may accurately identify different types of HPV (of low and high cancer risk) in cells from cytological screening of cervical lesions and, due to its high sensitivity, have been the focus of attention of many studies<sup>11-13</sup>. Using PCR as a diagnostic method, it is not always possible to identify the infecting virus type. The use of MY09/11 and GP5+/6+ primers in nested-PCR system was proposed as a way to reduce this limitation, in addition to enhancing detection sensitivity, with a

positivity rate of 38.8% higher than that when MY09/11 was used isolatedly; in this system, HPV can be detected in samples containing low number of viral DNA copies<sup>31</sup>. In the present study, in which MY09/11 and GP5+/6+ strategy was employed, amplification was obtained for HPV90 and HPVcand86 types, which, according to Terai and Burk (2002), do not amplify with MY09/11 isolatedly. Comparing genotyping result with MY09/11 and GP5+/6+ primers isolatedly, Speich et al (2004), verified that MY failed to amplify types 30, 42, 43, 51, 59, 67, 74, 92 and 91 and GP was not able to amplify types 61 and 62. In this study, types 59, 67, 90, 61 and 62 were amplified, being type 62 the sixth most prevalent.

In this study, 35 virus types have been identified, two of them not yet been taxonomically classified, namely isolated JEB and the type JEB2. Furthermore, 16 high risk genotypes have been identified, two of them (HPV67 and HPV70), not included in the set investigated by HC2 test. All of this indicates the large variety of virus present in clinical samples and the importance of PCR and sequencing as helpful tools to provide relevant information on HPV infection.

TS-PCR for the seven HPV searched (6, 11, 16, 18, 31, 33 and 35) has identified types or at least one type in only 94/260 (36%) of cases. These types have been chosen considering that types 16, 18, 31, 33 and 35 are among the eight most prevalent types in cervical cancer worldwide<sup>34</sup>, therefore with a greater importance, and types 6 and 11, of a low risk, as they are found in up to 95% of cases of condyloma acuminatum. The low effectiveness of this method in genotyping may be attributed to the small number of types investigated besides the great variety of types present in these patients. Sequencing has identified virus types in a larger number of cases (196/260, 75%), in addition to having recognized 28 types absent from the panel investigated by TS-PCR. Nevertheless, it has presented a disadvantage in identifying genotypes in samples with multiple infections, in which viral sequences overlaps and it is not possible to distinguish the various types, finding also reported by others<sup>22,35,36</sup>. In this study, sequencing was able to identify types in only four cases of multiple infection, those having only two virus types in the sample. By sequencing, 25% of cases have not been genotyped.

The greatest advantage of TS-PCR was to identify virus types or at least one of them in cases of multiple infection (53/86, 62% of the samples in this series). However, this procedure requires several reactions for each sample, being more laborious in the laboratory practice, opinion also shared by Lin et al (2008). According to these authors, several reactions are required to investigate the great number of virus types, which makes this strategy inviable for studies in large scale.

Results of both methodologies have been discrepant in 19 cases. In 10 of these cases, TS-PCR has identified type 33 and sequencing has identified types 58 (4 cases), type 67 (4 cases), type 62 (1 case), types 56/58 (1 case); in 2 cases, TS-PCR has identified type 35, and sequencing, type 54 (1 case) and type JEB2 (1 case); in seven other cases, sequencing has shown only one virus type in the sample, whereas TS-PCR has shown more than one type. Such discordances may be attributed to favoring the amplification of these types in the PCR reaction, phenomenon which may happen when there is more than one virus type; in these cases, the type or types amplified are those existing in larger amount in the sample. Kado et al (2001) compared typing from sequencing (n=107) with five different primers (GP17/18, MY09/11, L1C1/L1C2+L1C2M, pU1M-L/pU-2R and pU1M-L/pU-2R-N),

having found a different genotyping in 5 cases, considered as multiple infection; according to the authors, different types of HPV were preferably amplified depending on the primer used. Although this possibility is plausible, more studies are necessary in order to explain such differences.

As it has already been reported in other studies<sup>19,35</sup> and in spite of its limitations, sequencing has been considered the gold standard for HPV genotyping, due to the possibility of identifying virtually all virus types without given mistaken classifications by cross-reactions among similar types, a what may happen in tests based in hybridization. This study has shown that sequencing was more effective in recognizing types of HPV, having identified 4.2 more cases than TS-PCR for the seven types studied, and that both methods have advantages and disadvantages, the best approach being the combination of both methods.

Based on our results, we may suggest employing both methods as genotyping strategy for HPV in clinical practice, since both have been shown to be complementary methods. As sequencing has shown the greatest effectiveness in genotyping, we suggest starting by sequencing and, then, if necessary, in cases of multiple infection, employing TS-PCR. When choosing types to be investigated by TS-PCR, a panel should include the most prevalent high risk types and those with greater clinical relevance. Our findings, together with those from other studies<sup>19,31,38,39</sup> justify using TS-PCR after sequencing to identify DNA-HPV, considering the great variety of virus types, which are different in biological properties and carcinogenic risk.

### **Acknowledgments**

This work has been supported by Center for Research and Diagnosis (NUPAD), Faculty of Medicine, UFMG. The authors would like to thank Professor Arminda Siqueira Campos and Jacqueline Tibúrcio for their help with statistics.

### **References**

01. Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, et al. Worldwide prevalence and genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:453-59.
02. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
03. Haws ALF, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 2004; 122:87-93.
04. Munoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic Classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med* 2003; 348: 518-27.
05. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.

06. Montaldo C, Mastinu A, Quartuccio M, Piras V, Denotti G, Pisano E, et al. Detection and genotyping of human papillomavirus DNA in samples from healthy Sardinian patients: a preliminary study. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 482-7.
07. Bezerra, S. J. S., Gonçalves, P. C., Franco, E. S., Pinheiro, A. K. B., 2005. Perfil de mulheres portadoras de lesões cervicais por HPV quanto aos fatores de risco para câncer de colo de útero. *DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm.* 17(2), 143-148.
08. Carestiato FN, Silva KC, Balthazar DS, Silva L, Marinho M, Oliveira LHS, et al. Analysis of molecular biology techniques for the diagnosis of human papillomavirus infection and cervical cancer prevention. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(5): 428-32.
09. Giovannelli L, Lama A, Capra G, Giordano V, Arico P, Ammatuna P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: Analysis of the new PGMY-PCR compared to Hybrid Capture II and MY-PCR assay and two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3861-64.
10. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 80-88.
11. Gravitti PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, et al. Improved Amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1): 357-61.
12. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 940-45.
13. Kosel S, Burggraf S, Mommsen J, Engelhardt W, Olgemoller B. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting – improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridization. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(6): 787-91.
14. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 3176-84.
15. Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecol Oncol* 2003; 103:12-17.
16. Astori G, Arzese A, Pipan C, de Villiers E-M, Botta GA. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res* 1997; 50:57-63.
17. Mendez F, Munoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, van den Brule AJC, et al. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* 2005; 192:1158-65.
18. Kleter B, van Doorn, L-J, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2508-17.

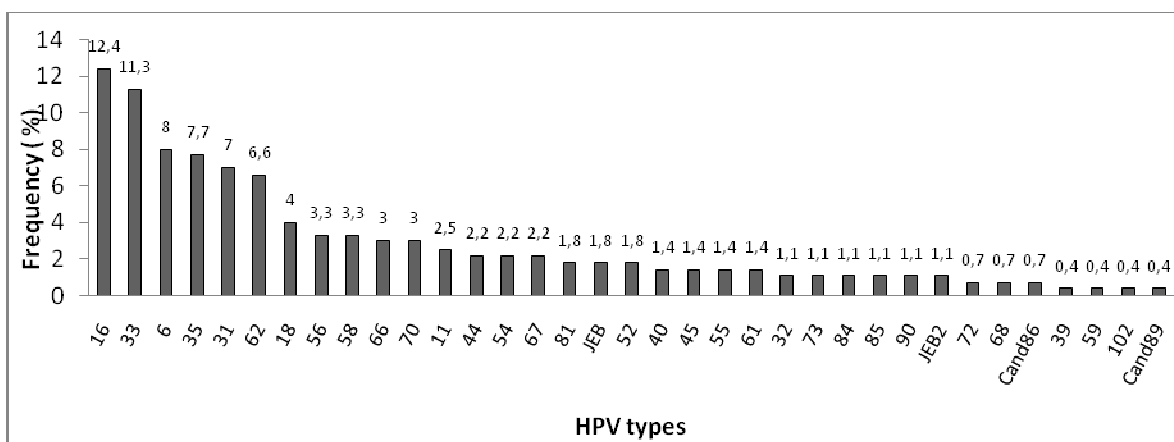
19. Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, Bernis A, Celio N, Lefevre P, et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 928-34.
  
20. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. *Infect Agent Cancer* 2007; 2(11).
  
21. Verteramo R, Pierangeli A, Calzolari E, Patella A, Recine N, Mancini E, et al. Direct sequencing of HPV DNA detected in gynaecologic outpatients in Rome, Italy. *Microbes Infect* 2006; 8:2517-21.
  
22. Choi Y-D, Jung W-W, Nam J-H, Choi H-S, Park C-S. Detection of HPV genotypes in cervical lesions by the HPV DNA chip and sequencing. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 369-75.
  
23. Lin C-Y, Chao A, Yang Y-C, Chou H-H, Ho C-M, Lin R-W, et al. Human Papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. *J Clin Virol* 2008; 42(4): 361-67.
  
24. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Clelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10:606-13.
  
25. Duggan MA, Inoue M, Mcgregor SE, Stuart GCE, Morris S, Poon VG, et al. A paired Comparison of dot blot hybridization and PCR amplification for HPV testing of cervical scrapes interpreted as CIN 1. *Eur J Gynaec Oncol* 1994; 15(3): 178-87.
  
26. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7:209-14.
  
27. de Roda Husman A-M, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76:1057-62.
  
28. Arndt A, Nottelmann K, Brock J, Neumann OG. Das invert papillom und seine assoziation mit dem humanen papillomavirus (HPV). *HNO* 1994; 42:670-76.
  
29. Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Filion M, Brochu P, Simard P, Russo PA, et al. A two-tier polymerase chain reaction direct sequencing method for detection and typing human papillomavirus in pathological specimens. *Diagn Mol Pathol* 1998; 7(6):317-23.
  
30. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
  
31. Pannier-Stockman C, Segard C, Bennamar S, Gondry J, Boulanger J-C, Sevestre H, et al. Prevalence of HPV genotypes determined by PCR and DNA sequencing in cervical specimens from French women with or without abnormalities. *J Clin Virol* 2008; 42(4): 353-60.

32. Terai M, Burk RD. Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: *candHPV89*, *cand HPV 90* and *candHPV91*. J Infect Dis 2002; 185:1794-97.
33. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the West German area. J Med Microbiol 2004; 53:125-28.
34. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. Vaccine 2006; 24S3:26-34.
35. Serrano ML, Correa M, Medina O, Melgarejo D, Bravo MM. Tipificación de virus del papiloma humano mediante secuencia directa em mujeres com citologia normal. Rev Colomb Cancer 2003; 7(4):18-24.
36. Vernon SD, Unger ER, Willians D. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. J Clin Microbiol 2000; 38( 2): 651-55.
37. Kado S, Kawamata Y, Shino Y, Kasai T, Kubota K, Iwasaki H, et al. Detection of human papillomavirus in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. Ginecol Oncol 2001; 81:47-52.
38. Capra G, Giovannelli L, Bellavia C, Migliore MC, Caleca MP, Perino A, et al. HPV genotype prevalence in cytologically abnormal cervical samples from women living in south Italy. Virus Res 2008; 133(2): 195-200.
39. Chow VTK, Loh E, Yeo WM, Tan SY, Chan R. Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. Pathology 2000; 32:204-8.



**TABLE 1**  
**Primer sequences**

Types	Sequences	Region of Viral Genome	Product Size
6A	5'-TAGGGGACGGTCCTCTATTC-3'		
6B	5'-GCAACAGCCTCTGAGTCACA-3'	LCR	258-361pb
11A	5'-GAATACATGCGCCATGTGGA-3'		
11B	5'-AGCAGACGTCCGTCCTCGAT-3'	L1	356pb
16A	5'-TCAAAGCCACTGTGTCCTG-3'		
16B	5'-CGTGTCTTTGATGATCTGCAA-3'	E6	271pb
18A	5'-TGGTGTATAGAGACAGTATACCCCA-3'		
18B	5'-GCCTCTATAGTGCCAGGTATGT-3'	E6	247pb
31A	5'-TGAACCGAAAACGGTTGGTA-3'		
31B	5'-CTCATCTGAGCTGTCCGGTA-3'	E6/E7	613pb
33A	5'-AGTAGGGTGTAAACCGAAAGC-3'		
33B	5'-CTTGAGGACACAAAGGTCTT-3'	E6	411pb
35A	5'-GAATTACAGCGGAGTGAGGT-3'		
35B	5'-CACCGTCCACCGATGTTATG-3'	E6	290pb



**Graphic 1: Frequency of the HPV types identified.**

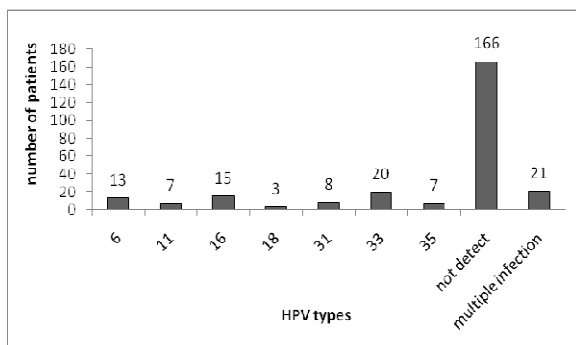
TABLE 2

## HPV genotypes in 260 cases

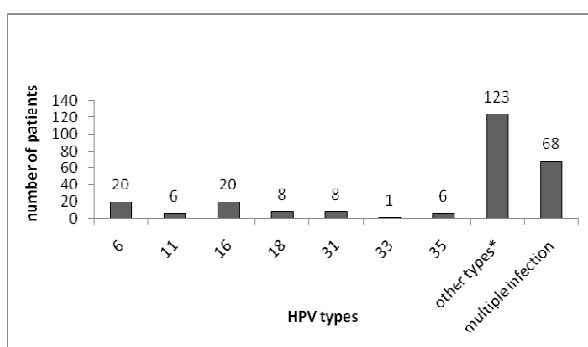
Simple infection		Multiple infection	
HPV types	#	HPV types	#
6	20	<b>33</b> and other (s)	8
<b>16*</b>	17	<b>33 e 67</b>	4
62	15	<b>33 e 58</b>	4
<b>56</b>	8	<b>16, 31 e 33</b>	3
<b>66</b>	8	<b>16 e 35</b>	3
<b>70</b>	8	<b>31 e 35</b>	3
<b>18</b>	6	<b>16</b> and other (s)	3
11	6	<b>31</b> and other (s)	3
<b>35</b>	6	<b>16, 33 e 35</b>	2
44	6	<b>16 e 18</b>	2
<b>31</b>	6	<b>35</b> and other (s)	2
54	5	<b>16, 31, 33 e 35</b>	1
81	5	<b>6, 16, 33 e 35</b>	1
JEB	5	<b>6, 18 e 33</b>	1
40	4	<b>18, 31 e 33</b>	1
<b>45</b>	4	<b>33, 56 e 58</b>	1
<b>52</b>	4	<b>33, 62 e</b> and other (s)	1
55	4	<b>16 e 31</b>	1
<b>58</b>	4	<b>31 e 35</b>	1
61	4	<b>18 e 33</b>	1
32	3	<b>16 e 33</b>	1
<b>73</b>	3	<b>33 e 62</b>	1
84	3	<b>52 e 67</b>	1
85	3	<b>35 e JEB2</b>	1
90	3	<b>35 e 54</b>	1
72	2	62 and other (s)	1
<b>68</b>	2	11 and other (s)	1
Cand86	2	Type not identify	33
JEB2	2	Subtotal	86
<b>33</b>	1		
<b>39</b>	1		
<b>59</b>	1		
<b>67</b>	1		
102	1		
Cand89	1		
Subtotal	174		
Total	260		

\* Boldface indicate high-risk type. Classification according de Villiers et al (2004).

## ANEXO D - ARTIGO



Graphic 2: genotyping by TS-PCR



Graphic 3: genotyping by sequencing

\* HPV types identified only by sequencing: 32, 39, 40, 44, 45, 52, 54, 55, 56, 58, 59, 62, 61, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 81, 84, 85, 90, 102, *can86*, *can89*, JEB and JEB2.

**TABLE 3**  
Analysis TS-PCR x sequencing

SEQUENCING	TS-PCR		Total
	Identified type	Not identified type	
Identified type	63	133	196
Not identified type	31	33	64
Total	94	166	260

CI de 95% for OR:  $[2,90 \leq OR_{\text{estimated}} \leq 6,34]$   
OR:  $133/31=4,29$

# 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](#)