



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

SEQUENCIAMENTO DA LONGA REGIÃO DE CONTROLE (LCR)
DE VARIANTES DO HPV 16 ISOLADAS NA REGIÃO AMAZÔNICA.

BOLSISTA: MAYARA RACHEL SILVA VILELA - VOLUNTÁRIA

MANAUS

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB – S /0041/2009

SEQUENCIAMENTO DA LONGA REGIÃO DE CONTROLE (LCR)
DE VARIANTES DO HPV 16 ISOLADAS NA REGIÃO AMAZÔNICA.

BOLSISTA: MAYARA RACHEL SILVA VILELA - VOLUNTÁRIA
ORIENTADORA: PROF^a. MSc. JÚNIA RAQUEL DUTRA FERREIRA
COLABORADORA: PROF^a. DR^a. CRISTINA MARIA BORBOREMA
DOS SANTOS

MANAUS

2010

RESUMO

O câncer do colo do útero é o tipo de neoplasia mais incidente na região Norte, representando 23 casos novos em cada 100.000 pessoas, sem considerar os tumores de pele não melanoma (INCA, 2009). Estima-se que, em 2010, ocorram 560 casos novos de câncer no colo do útero no estado do Amazonas, com 430 casos novos na cidade de Manaus. Como o papilomavírus humano (HPV) é considerado o agente principal para o desenvolvimento dessa neoplasia, é de relevante importância estudo dos tipos e variantes que infectam a população dessa região, pois estes têm impacto na progressão de lesões pré-malignas a neoplasias (INCA, 2009). Os estudos de Ferreira (2007) são referência para a caracterização da diversidade de tipos de HPV presentes na região de Manaus e circunvizinhanças. Todavia, esse estudo não caracteriza as variantes do HPV 16 nas amostras estudadas. As diferenças entre variantes do HPV 16 podem implicar em divergências quanto a vários aspectos da patogenicidade viral, incluindo diferenças nos padrões de regulação da expressão de genes virais a partir da Longa Região de Controle (LCR), uma região não codificante que contém sequências de controle para a regulação e expressão gênica dos HPV (GEMIGNANI et al., 2004; LIZANO et al., 2006). Com isso, um estudo detalhado da região LCR pode elucidar questões inerentes a aspectos das infecções relacionados à diversidade molecular do vírus. Com intuito de sequenciar a região LCR do HPV 16 detectado em amostras de pacientes com lesão de colo de útero, além de identificar as regiões regulatórias de LCR, as variantes do HPV 16 e relacionar com a lesão das pacientes estudadas este trabalho foi proposto. As amostras com HPV 16 (n=80) a serem estudadas fazem parte do banco de amostras do Laboratório de diagnóstico Molecular, CAM, UFAM. Foi possível detectar a presença de DNA genômico e amplificar a região LCR nas 80 amostras estudadas. Em 21 amostras foi possível ligar os fragmentos de DNA no vetor de clonagem TOPO e então inseri-los em *E.coli*, pela transformação por eletroporação. Após a transformação, os plasmídios recombinantes foram então extraídos e analisados. Por motivo de falha no sequenciador MegaBace (*Amersham Bioscience*), as amostras não puderam ser sequenciadas para que suas regiões fossem comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Porém, pode-se observar que, das pacientes com este DNA-vírus, a lesão predominante foi Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL), com 71%, seguida de carcinoma invasor com 15%. A faixa etária das pacientes estudadas foi de 23 a 73 anos, porém com maior frequência no intervalo de 31 a 40 anos, com 36% (n=29). Um estudo detalhado da região LCR poderia elucidar questões inerentes a aspectos das infecções relacionados à diversidade molecular do vírus, possibilitando conhecimento dos HPV que infectam populações desta região e se suas variantes possuem um maior potencial oncogênico, comparando-se ao demais já descritos na literatura.

Palavras Chaves: HPV 16, LCR, Sequenciamento.

ABSTRACT

Cancer of the cervix is the most frequent type of cancer in the North, representing 23 new cases per 100.000 persons, without regard to non-melanoma skin tumors (INCA, 2009). It is estimated, in 2010, 560 new cases of cervix cancer in Amazonas State, with 430 new cases in Manaus. As the human papillomavirus (HPV) is considered the main agent for the development of this neoplasm, it is important a study of types and variants that infect the population of this region, since these have an impact on the progression of premalignant lesions to cancer (INCA, 2009). Studies by Ferreira (2007) are a reference to characterize the diversity of HPV types present in the region of Manaus and surroundings. However, this study does not characterize the variants of HPV 16 in all samples. The differences between variants of HPV 16 may result in differences in various aspects of viral pathogenicity, including differences in patterns of regulation of the viral genes expression from the Long Control Region (LCR), a non coding region that contains the control sequences for the HPV regulation and gene expression (GEMIGNANI et al., 2004; LIZANO et al., 2006). This is, a detailed study of the LCR region may elucidate questions related to aspects of infections related to the molecular diversity of the virus. In order to sequence the region of HPV 16 LCR detected in samples from patients with lesions of the cervix, in addition to identifying the regulatory regions of LCR variants of HPV 16 and relate to the injury of the patients studied this work was proposed. Samples with HPV 16 (n = 80) to be studied are part of the bank of samples from the Laboratory of Molecular Diagnosis, CAM, UFAM. It was possible to detect the presence of genomic DNA and amplify the region LCR in 80 samples studied. In 21 samples it was possible to link the DNA fragments in the TOPO cloning vector and then inserting them into *E.coli* by transformation by electroporation. After processing, the recombinant plasmids were then extracted and analyzed. By reason of failure in MegaBace sequencer (Amersham Bioscience), the samples could not be sequenced so that their regions were compared with other sequences deposited in the NCBI database (National Center for Biotechnology Information). However, one can observe that, of patients with this DNA virus, the predominant lesion was squamous intraepithelial lesion high-grade (HSIL), with 71%, followed by invasive carcinoma at 15%. The age of patients studied was 23-73 years, but more often in the range 31-40 years, with 36% (n = 29). A detailed study of the region LCR could elucidate issues related to aspects of infections related to the molecular diversity of the virus, enabling knowledge of HPV that infect people of this region and its variants have a higher oncogenic potential, comparing to other existing in literature.

Keywords: HPV 16, LCR, sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
16R4	Oligonucleotídeo que amplifica um fragmento de 1992pb
água Milli-Q	água ultra purificada
Br	Branco
C+	Controle Positivo
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
DST	doença sexualmente transmissível
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Regulação da replicação
E2	Regulação da transcrição viral
E2F	Ativador de promotores de genes
E4	Alteração da matriz intracelular
E5	Estímulo do crescimento
E6	Estímulo do crescimento
E7	Região Precoce do Genoma Viral
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético

FCECON-AM	Fundação Centro e Controle de Oncologia do Amazonas
GATA	Região microsatélite
HCl	ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Câncer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISO3G	Oligonucleotídeo que amplifica um fragmento de 265pb
Kb	kilobyte
kV	Kilovolts
L1	Proteína principal do capsídeo
L2	Proteína secundária do capsídeo
LB	Luria-Bertani
LCR	Longa Região de Controle
LDM	Laboratório de Diagnóstico Molecular
LSIL	Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau
M	molar
M'	Marcador
mg	miligrama
MgCl	cloreto de magnésio
MgSO	sulfato de magnésio
mL	mililitros

mM	milimolar
MY11	Oligonucleotídeo que amplifica um fragmento de 1992pb
n	número
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
NIC I-II-III	neoplasia intra-epitelial cervical (Graus I, II, III)
nm	nanômetro
p/v	peso/volume
p53	Proteína responsável pelo apoptose
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	potencial hidrogenionico
pM	
pmol	picomol
pRB	Proteína do retinoblastoma
Rpm	rotação por minuto
TE	solução tampão
TEB	Tris borato e EDTA
TPK	tampão proteolítico
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
U	unidade
UV	ultravioleta
V	volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Genoma do HPV.....	16
Figura 2: Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM	31
Figura 3: Roteiro de clonagem para sequenciamento do DNA purificado..	38
Figura 4: Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio dos produtos amplificados por PCR para diagnóstico molecular de DNA genômico, utilizando o iniciador ISO 5pmol, que amplifica um fragmento de 265 pb.....	43
Figura 5: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR para amplificação da região LCR, utilizando os iniciadores MY11 e 16R4, que amplificam um fragmento de 1992 pb.....	44
Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR para amplificação da região LCR, após purificação	45
Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR de plasmídios recombinantes.....	47
Figura 8. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR de plasmídios recombinantes....	48

LISTA DE GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS

Gráfico 1. Tipos de lesão do colo do útero das 80 pacientes positivas para HPV 16.....	49
Gráfico 2: Distribuição das mulheres em estudo quanto à faixa etária.....	49
Quadro 1: Classificação de risco e tipos de HPV (modificado).....	18
Quadro 2: Genes de Papilomavírus Humano e suas requeridas funções	19
Tabela 1: Estimativas para o Brasil no ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	21
Tabela 2: Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, Região Norte.....	21
Tabela 3: Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária – Amazonas e Manaus.....	22
Tabela 4: Média de idade das pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas e portadoras do HPV 16.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Papilomavírus humano (HPV).....	15
2.2	Classificação e estrutura genômica do HPV.....	16
2.3	Epidemiologia.....	20
2.4	HPV 16 e as variantes.....	23
2.5	Mecanismos oncogênicos do HPV.....	24
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Geral.....	28
3.2	Específicos.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Modelo de Estudo.....	29
4.2	Amostras.....	29
4.3	Critérios de Elegibilidade.....	30
4.3.1	Critérios de Inclusão.....	30
4.3.2	Critérios de Exclusão.....	30
4.4	Procedimentos.....	30
4.4.1	Coleta.....	30
4.4.2	Procedimentos para amplificação da Longa Região de Controle (LCR).....	31
4.4.2.1	Extração do DNA.....	32
4.4.2.2	Amplificação controle do DNA.....	33
4.4.2.3	Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>).....	34

4.4.2.4	Amplificação da região LCR por PCR.....	35
4.5	Purificação do DNA amplificado.....	36
4.6	Clonagem em <i>Escherichia coli</i> com o produto de PCR.....	37
4.7	Reação de Sequenciamento.....	41
4.7.1	Sequenciamento.....	42
4.8	Análise dos Dados.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Viabilidade das amostras.....	43
5.2	Amplificação da Longa Região de Controle.....	44
5.3	Amplificação da Longa Região de Controle.....	44
5.4	Gel de Purificação.....	45
5.5	Clonagem.....	46
5.6	Faixa Etária.....	49
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	54
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	55
	ANEXO A.....	64

1. INTRODUÇÃO

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e são agentes que podem acometer epitélios de diferentes hospedeiros, sendo espécie-específicos e podendo induzir a papilomas e câncer nos hospedeiros suscetíveis. No homem, esses DNA-vírus apresentam tropismo por células do epitélio cutâneo-mucoso, que são células de metabolismo elevado, acometendo principalmente o trato genital feminino e masculino. Os Papilomavírus Humanos (HPV) estão relacionados com lesões benignas e malignas em diversas partes do corpo (BEKKERS et al., 2004; BOSCH et al., 2002; DE VILLIERS et al., 2004; GROSS; BARASSO, 1999; SANCLEMENTE; GILL, 2002; VILLA, 1997).

Em 99% das vezes, o ácido desoxirribonucléico (DNA) do HPV encontra-se presente nas pacientes portadoras de câncer cervical, principalmente os de alto risco e suas variantes não-européias, sendo esta infecção considerada um fator crucial no desenvolvimento da malignidade do epitélio cervical (BOSCH et al., 2002; FERENCZY; FRANCO, 2002; LIU et al., 2004).

O carcinoma cervical tem apresentado uma distribuição mundial, com aproximadamente 500.000 mulheres desenvolvendo esta patologia em todo o mundo, a cada ano. Em países em desenvolvimento, o carcinoma cervical é uma das primeiras causas de morte em mulheres, geralmente precedido por câncer de pele e de mama (IARC, 2007; INCA, 2005; WHO, 2005).

Na região Norte, observa-se uma alta incidência de câncer de colo uterino que, diferentemente dos outros locais do país, ultrapassa os índices do

câncer de mama. A literatura relata como principal fator de risco para o câncer de colo de útero a infecção pelo HPV (GROSS; BARRASSO, 1999; ZUR HAUSEN, 1996; RIVOIRE et al., 2001; SATHISH et al., 2004; SCHIFMAN et al., 2005; SOLIMAN et al., 2005; WARTON; TORTOLERO-LUNA, 2000).

O potencial carcinogênico do HPV está relacionado com duas proteínas virais, E6 e E7, tendo capacidade de interagir com proteínas que regulam o ciclo celular e que atuam como supressoras de tumores, como a p53 e pRb. Através desta interação, ocorre à degradação e inativação das proteínas celulares, o que conduziria à transformação, imortalização celular e, posteriormente, a formação de neoplasias (SOUTO et al., 2005).

O HPV 16 é o tipo predominantemente mais detectado na neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de alto grau e no carcinoma invasivo cervical. Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que as variantes do HPV 16 são, preferencialmente, associadas com lesões de alto grau ou progressivas lesões cervicais, sugerindo uma relação no destino da infecção viral entre HPV 16 e suas variantes (DUIN et al., 2000; GEMIGNANI et al., 2004; SATHISH et al., 2004).

As variantes do HPV 16 (Européia, Asiática, Asiática-Americana, Africana e Norte Americana) apresentam diferença de menos de 2% do tipo viral referente ao HPV 16 em genes codificadores como E6, E7, L1 e L2 e acima de 5% na região não-codificadora LCR. Esse polimorfismo na sequência das variantes de HPV 16 parece alterar suas propriedades biológicas (LIZANO et al., 2006; PILLAI et al., 2002).

Estudos epidemiológicos de grande escala em análises simultâneas de várias regiões das variáveis do HPV 16 têm proporcionado novas perspectivas

sobre o significado biológico das variantes do HPV 16, esclarecendo se as variações de uma ou mais regiões do genoma do HPV 16 estão associados com a persistência da infecção viral e o desenvolvimento das lesões cervicais (GEMIGNANI et al., 2004; SATHISH et al., 2004).

Desta forma, a identificação das variantes do HPV 16 em amostras de mulheres com lesões de colo de útero poderia esclarecer aspectos relacionados à patogenicidade viral, já que estas variantes parecem contribuir no aumento da gravidade do câncer cervical.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Papilomavírus humano (HPV)

Consideradas um problema de saúde pública, as doenças sexualmente transmissíveis (DST) vêm aumentando sua incidência nos últimos anos. Este aumento ocorre em consequência das baixas condições socioeconômicas e culturais, das péssimas atuações dos serviços de saúde, do despreparo dos profissionais de saúde e de educação, e da falta de uma educação sexual adequada, principalmente voltada para os jovens (WHO, 2010).

Dentre as DST, o Papilomavírus humano (HPV) é um dos agentes mais comuns, podendo causar condilomas acuminados, que são considerados fatores de risco para displasias. Além disso, o HPV é considerado o principal fator para o desenvolvimento da neoplasia intraepitelial cervical (NIC) e o carcinoma cervical, com relação causal bem estabelecida entre o câncer cervical e a infecção por HPV (BEKKERS et al., 2004; MAGI et al., 2006; RAMA et al., 2008).

Em 99,7% das pacientes com câncer cervical e suas lesões precursoras, o HPV, um DNA-vírus, está presente, com tropismo e ciclo de desenvolvimento tanto nas mucosas quanto nos tecidos cutâneos, que são células de metabolismo elevado (SANCLEMENTE; GILL, 2002; KADAJA, 2009).

O HPV acomete principalmente o trato genital feminino e masculino e sua classificação está relacionada com sua capacidade de originar lesões

malignas ou benignas em diversas partes do corpo, dividindo-se em potencial de baixo e alto risco oncogênico (RAMA et al., 2008; SOUTO et al., 2005).

Os HPV de baixo risco estão comumente associados a verrugas genitais e os de alto risco representam, hoje, o maior fator de risco de desenvolvimento do carcinoma cervical, sendo bastante frequente a infecção em adolescentes sexualmente ativos, ocorrendo através do contato sexual com os epitélios vaginal, vulvar, cervical, peniano ou anal infectados (MCMURRAY et al., 2001).

2.2 Classificação e estrutura genômica do HPV

Os HPV são pequenos vírus de DNA de dupla fita com aproximadamente 8000 pares de base (pb) na forma de cromatina, semelhante a um complexo celular de histonas. As partículas do vírus são proteínas sem envelope, com um diâmetro de 55-60 nm e tem uma estrutura icosaédrica (Figura 1) (SOUTO et al., 2005; ZHENG; BAKER, 2006).

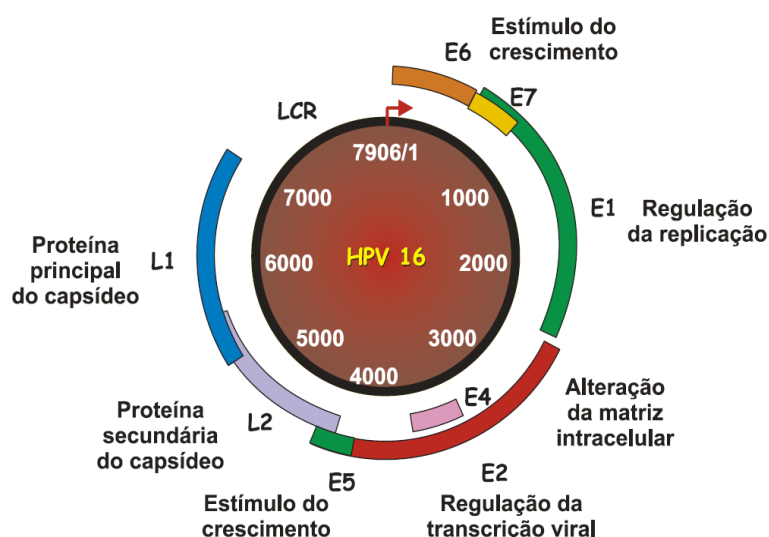


Figura 1. Genoma do HPV 16.
Fonte: DAUD, 2005.

Atualmente, mais de 120 novos tipos de HPV foram detectados, porém apenas 85 deles foram sequenciados e caracterizados. A taxonomia dos tipos, subtipos e variantes de papilomavírus foram identificadas através de uma análise filogenética baseada na comparação da sequência nos genes L1, E6 e E7, onde se considera um novo tipo de HPV quando as sequências nucleotídicas dos genes diferem em mais de 10% dos tipos conhecidos, 2 a 10% quanto ao subtipo e até 2% quanto à variante dos tipos já descritos (SANCLEMENTE; GILL, 2002; SOUTO et al., 2005; ZHENG; BAKER, 2006).

O HPV apresenta variantes do tipo 16, que são referidas como européia, asiática, asiático-americana, africana e norte-americana e apresentam diferença na sequência nucleotídica em menos de 2% na Longa Região de Controle (LCR) e de mais de 5% no gene E5. Essas variações foram encontradas para mostrar a distribuição das diferentes regiões, com distintos potenciais oncogênicos dessas variantes e persistência da infecção pelos vários tipos de HPV (LIZANO et al., 2006; MORRAROS et al., 2006; PANDE et al., 2008).

Ao infectar o organismo, o tipo de HPV parece determinar sua manifestação clínica, com tropismo por células do epitélio cutâneo-mucoso, por isso os HPV foram classificados em cutaneotrópicos e mucosotrópicos (Quadro 1). A diferença é encontrada na manifestação clínica, apresentando-se em tumores benignos e malignos, permitindo classificá-los como HPV de baixo e alto risco oncogênico (RAMA et al., 2008; SOUTO et al., 2005).

Classificação de Risco	Tipos de HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Provável alto risco	26, 53, 66
Risco indeterminado	34, 57, 83
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Quadro 1 - Classificação de risco e tipos de HPV (modificado).
 Fonte: BAZAN, 2007; SOUTO et al., 2005.

A estrutura do HPV possui basicamente três regiões: as de expressão de proteínas virais não estruturais, que são reguladas por regiões do genoma viral que se expressam precocemente (*Early*, E), representadas por E1, E2, E4, E5, E6 e E7, as proteínas estruturais do capsídeo viral que se expressam tardiamente (*Late*, L), representadas por L1 e L2 e altamente conservadas nos HPV, e a região regulatória, que representa cerca de 10% do genoma do HPV, denominada Longa Região de Controle (LCR) (Quadro 2) (SATHISH et al., 2004; ZHENG; BAKER, 2006).

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	E1	Atividade DNA helicase, Atividade DNA ATP-dependente, ligando ATPase. Papel na replicação e na repressão da replicação.
	E2	Regulador da transcrição e replicação viral, controle da expressão do gene da região viral inicial, necessário para eficiente replicação viral, juntamente com E1.
	E4	Expressa como um gene tardio, principalmente na diferenciação do epitélio, tem papel na infecção produtiva, associada ao citoesqueleto de queratina de cultura, nas células epiteliais e na saída viral.
	E5	Transforma a atividade em HPV-16 in vitro. Estimula a proliferação celular "in vivo" benigno, mas pode ter um papel no inicial na carcinogênese.
	E6	Papel no processo de transformação, juntamente com E7. Propriedades de ativação transcricional. Os genes E6 de HPV de alto risco inativa a p53 induzindo sua degradação. Juntamente com E7 fornece um ambiente celular para a replicação do DNA viral.
	E7	Propriedades de transativação similares ao do promotor E2 do adenovírus induz a síntese de DNA em células quiescentes, papel na transformação celular em cooperação com o oncogene <i>ras</i> ativado. E7 se liga à forma hipofosforilada da proteína do retinoblastoma (pRB), resultando em sua inativação funcional, permitindo a progressão celular para a fase S do ciclo celular. Proteínas E7 dos HPVs de baixo risco tipo 6 e 11 se ligam menos eficientemente do que as proteínas E7 de HPVs de alto risco (tipos 16 e 18).
Tardia	L1	Codifica a proteína principal do capsídeo.
	L2	Codifica a proteína secundária do capsídeo.
Regulatória	LCR	Estimula e reprime a transcrição e dá origem à replicação.

Quadro 2. Genes do Papilomavírus Humano e suas referidas funções.
 Fonte: SANCLEMENT; GILL, 2002; SOUTO et al., 2005.

A infecção pelo HPV inicia-se pela penetração do vírus em locais de microtraumas. Seu ciclo de vida ocorre no epitélio estratificado da pele ou mucosa, onde seu genoma é transportado para o núcleo das células (KADAJA et al., 2009).

O epitélio estratificado é um tecido complexo, composto por células diferentes, incluindo camadas queratinócitas em diferenciação. Essas células se dividem de duas maneiras: uma lentamente, formando células indiferenciadas, outra formando células de proliferação transitória e células do compartimento basal (KADAJA et al., 2009; ZUR-HAUSEN, 2002).

As células indiferenciadas proliferam-se e são o alvo inicial do HPV. Quando a membrana basal é infectada, esta se prolifera, movendo-se para o compartimento suprabasal, formando uma infecção latente de toda a proliferação celular, podendo permanecer por tempos variáveis (QIU et al., 2007; ZUR-HAUSEN, 2002).

Quando os queratinócitos são infectados, eles saem do ciclo celular e ocorre morte celular programada. Porém, os HPV evoluíram mecanismos para se adaptarem às vias de controle de crescimento celular normal e ajustar seu ciclo de replicação de DNA (DOORBAR, 2005; KADAJA et al., 2009, PANDE et al., 2008; QIU et al., 2007).

2.3 Epidemiologia

Em todo o mundo, o câncer de colo de útero é o segundo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, onde ocorrem aproximadamente cerca de 500 mil casos novos por ano, atrás apenas do câncer de mama. Essa situação é um desafio para as políticas de saúde voltadas para as mulheres. Nos países subdesenvolvidos, essa estimativa é cerca de duas vezes maior se comparado com países desenvolvidos (LIZANO et al., 2006; RAMA et al., 2006).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que ocorram, no Brasil, em 2010, cerca de 18.430 casos novos de câncer de colo de útero, com um risco estimado de 18 casos a cada 100.000 mulheres (Tabela 1) (INCA, 2009a).

Na Região Norte, esta incidência está em cerca de 1.820 casos novos, estimando-se 23 casos novos a cada 100.000 mulheres. Esse fato aponta o câncer cervical como o primeiro entre os tumores malignos femininos,

comparando-se com as demais regiões do país, onde o câncer de mama ocupa o primeiro lugar (Tabela 2) (INCA, 2009b).

No Estado do Amazonas, essa incidência está em 560 casos novos, sendo que destes, 430 na cidade de Manaus (Tabela 3) (INCA, 2009c).

- Brasil

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traqueia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

Tabela 1. Estimativas para o Brasil no ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.
Fonte: INCA, 2009a.

- Região Norte

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	1.350	16,62	800	31,17
Colo do Útero	1.820	22,82	960	37,49
Cólon e Reto	320	4,03	210	8,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	410	5,05	240	9,34
Estômago	440	5,64	260	10,13
Leucemias	250	3,05	140	4,38
Cavidade Oral	150	1,60	100	2,84
Pele Melanoma	80	0,44	60	0,88
Esôfago	80	0,63	50	0,91
Outras Localizações	3.060	38,09	1.750	68,31
Subtotal	7.960	99,07	4.570	178,37
Pele não Melanoma	2.230	27,90	920	35,51
Todas as Neoplasias	10.190	126,76	5.490	214,32

Tabela 2. Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, Região Norte.
Fonte: INCA, 2009b.

- Amazonas e Manaus

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	310	17,26	240	26,13
Colo do Útero	560	31,18	430	46,15
Cólon e Reto	80	4,44	70	7,40
Traqueia, Brônquio e Pulmão	120	6,76	100	10,54
Estômago	110	6,30	80	9,18
Leucemias	50	2,89	40	4,38
Cavidade Oral	30	1,51	20	2,49
Pele Melanoma	**	0,30	**	0,58
Esôfago	**	0,55	**	0,81
Outras Localizações	940	52,29	760	82,06
Subtotal	2.220	123,50	1.760	190,03
Pele não Melanoma	370	20,82	300	32,08
Todas as Neoplasias	2.590	144,04	2.060	222,36

Tabela 3. Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária – Amazonas e Manaus. Fonte: INCA, 2009c.

Portanto, o câncer de mama está ligado a um fator genético, e o de colo de útero, à infecção pelo HPV. E estima-se que cerca de 25% das mulheres da população estejam infectadas pelo vírus, porém somente uma pequena fração, entre 3% a 10% das mulheres infectadas com algum tipo de HPV com alto risco de câncer, desenvolverá a neoplasia (MORAROS et al., 2006; MS, 2000).

A Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*Internacional Agency for Research on Câncer* - IARC) classifica o papilomavírus humano tipo 16 como altamente carcinogênico para raça humana. A infecção pelos tipos virais de alto risco do HPV é condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (IARC, 2007; RAMA et al., 2008).

Outros fatores também podem influenciar para o desenvolvimento do carcinoma cervical, como o uso prolongado de contraceptivos orais, multiparidade, múltiplos parceiros sexuais, início sexual precoce, baixa ingestão de vitaminas, tabagismo e coinfeção com agentes como o Vírus da

Imunodeficiência Humana (HIV), *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (INCA, 2009; SOUTO et al., 2005).

2.4 HPV 16 e as variantes

Mesmo que haja muitos tipos de HPV identificados, apenas 17 deles são classificados como de alto risco e considerados fatores causais para o carcinoma cervical. Os HPV 16 e 18 são os mais comumente identificados em câncer de colo de útero e em suas lesões precursoras, chegando a 40 a 60% e 10 a 20%, respectivamente, de todos os casos (DUIN et al., 2000; LIZANO et al., 2006).

Além da infecção pelo vírus e os outros fatores para predisposição no desenvolvimento da neoplasia, variantes virais também podem oferecer um risco relativamente mais elevado para transformação maligna. As variantes de HPV são definidas por possuírem mais de 98% de identidade na sequência nucleotídica dos genes E6, E7 e L1 (MCMURRAY et al., 2001; SANCLEMENTE; GIL, 2002).

Variantes do HPV 16 apresentam variância estrutural e numérica quanto à sequência de nucleotídeos e essa diferença parece alterar o comportamento biológico da infecção e, conseqüentemente, a transformação maligna (DOORBAR, 2004; RIVIORE et al., 2001).

2.5 Mecanismos oncogênicos do HPV

Para uma célula se tornar maligna, ocorrem alterações genéticas envolvendo a ativação de vários oncogenes e perda de genes supressores tumorais. Proteínas multifuncionais são codificadas por pequenos vírus DNA, que são chamadas de oncoproteínas (DAUD, 2005; DOORBAR, 2004).

Normalmente, essas oncoproteínas não possuem atividade enzimática intrínseca, porém, agem alterando a atividade de proteínas celulares envolvidas na proliferação. Algumas dessas oncoproteínas dos HPV são E6 e E7 (DAUD, 2005; DOORBAR, 2004; RIVIORE et al., 2001).

Os produtos dos genes virais E6 e E7 podem exercer seus efeitos interferindo nas proteínas que regulam o crescimento celular, estando diretamente relacionados com as transformações genéticas da célula, levando-a malignidade (PILLAI et al., 2002; RIVIORE et al., 2001).

As oncoproteínas virais do HPV 16, E6 e E7, degradam as proteínas supressoras de tumores, p53 (proteína responsável pelo apoptose) e pRb (proteína do retinoblastoma), respectivamente, imortalizando células humanas e resultando na perda de controle do ciclo celular (GEMIGNANI et al., 2004; PILLAI et al., 2002).

A p53 tem função de monitorar a saúde celular, a integridade de seus cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo, auxiliando no início da apoptose. Se ocorrer dano celular, a p53 ativa a expressão de proteínas celulares, levando a uma interrupção da fase G1 do ciclo celular e deixando de induzir a apoptose (DAUD, 2005).

A atividade oncogênica da proteína E6 é verificada, em muitos ensaios biológicos, causando imortalização de células primárias, transformação de linhagens celulares, resistência à diferenciação terminal, tumorigênese e alteração dos estágios do ciclo celular, com interferência relacionada à p53 (DAUD, 2005; GEMIGNANI et al., 2004; RAMA et al., 2008; RIVOIRE et al., 2001).

A inativação da pRb ocorre quando a proteína E7 liga-se a ela, na fase G1 do ciclo celular, inativando-a e liberando E2F, um ativador de promotores de genes que codificam sinais positivos de crescimento celular, resultando na ação estimuladora dos produtos desses genes sobre a progressão do ciclo celular (DAUD, 2005; RIVOIRE et al., 2001; ZUR HAUSEN, 2002).

A ligação das oncoproteínas E6 à p53 e E7 à pRb derivadas dos HPV de alto e baixo risco oncogênico apresenta diferenças, com elevada afinidade e baixa afinidade, respectivamente. A comparação do potencial oncogênico dos HPV de alto risco e de baixo risco pode estar relacionada a essa diferença de afinidade (DAUD, 2005; GEMIGNANI et al., 2004; RIVOIRE et al., 2001; SATHISH et al., 2004).

A expressão das oncoproteínas E6 e E7 é controlada pela proteína viral E2. A integração do genoma viral do HPV 16 ao genoma celular ocorre durante a progressão das lesões cervicais do estado pré-invasivo ao invasivo. Isso provoca a ruptura do gene viral E2, resultando assim na remoção do efeito repressor da classe E2, o promotor de E6 e E7. Esse efeito resulta, finalmente, em aumento da expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 (LIZANO et al., 2006; PILLAI et al., 2002; SATHISH et al., 2004).

A ruptura no gene E2 é considerada, muitas vezes, um fator de risco para desenvolvimento das lesões pré-malignas e malignas e, conseqüentemente, ao carcinoma cervical. A maioria dos estudos relata uma frequência baixa nas formas epissomais no gene E2 de HPV 16 encontrados no carcinoma invasor e poucos estudos relatam uma frequência intacta de formas no gene E2 do DNA viral de HPV 16 no câncer invasivo. Diante disso, foi proposto que variações de HPV podem afetar o potencial oncogênico para o desenvolvimento do câncer cervical (LIZANO et al., 2006; SATHISH et al., 2004).

A LCR regula a transcrição das proteínas da região precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e possui variações nas sequências regulatórias e de codificação. É provável que essas diferenças sejam a explicação para as alterações em suas propriedades biológicas (DOORBAR, 2004; LIZANO et al., 2006; ZUR HAUSEN, 1996).

A região LCR não é codificante e contém sequências de controle para a regulação e expressão gênica dos HPV. Essa regulação é complexa, sendo controlada por fatores de transcrição celulares e virais que, na maioria das vezes, tem a participação da LCR, que varia substancialmente em sua composição nucleotídica entre os tipos de HPV. A LCR dos HPV anogenitais variam de tamanho, apresentando de 800 a 900 pb (PANDE et al., 2008; SATHISH et al., 2002; ZUR HAUSEN, 1996).

Tem sido demonstrado que certos polimorfismos do HPV 16 na sua Longa Região de Controle (LCR) influenciam na atividade promotora transcricional de E6 e E7 oncogênicos, enquanto que variações nos genes

virais levam a substituições de aminoácidos, modificando as funções biológicas das proteínas codificadas ou, possivelmente, as propriedades antigênicas do HPV 16 e suas variantes podem alterar o destino da infecção viral e suas propriedades biológicas (GEMIGNANI et al., 2004; LIZANO et al., 2006; RAMA et al., 2008).

Comparando variantes do HPV 16 com ou sem algumas alterações na sequência nucleotídica, as variantes de LCR que possuem uma elevada porcentagem de alterações nos seus genes parecem aumentar o risco de desenvolvimento de NIC de alto grau (DUIN et al., 2000; LIZANO et al., 2006).

Desta forma, através da amplificação da Longa Região de Controle de HPV 16, será possível sequenciar e identificar as variantes deste vírus em amostras de pacientes amazonenses com lesões pré-malignas ou malignas do colo do útero.

A oncologia das variantes de HPV pode diferir entre as regiões geográficas devido à distribuição dos tipos de vírus entre as populações. O número de casos de câncer de colo de útero na região Norte ultrapassa o das demais regiões brasileiras, sendo um desafio para saúde pública. O conhecimento dos HPV que infectam estas populações é de suma importância para verificar se estes vírus possuem um maior potencial oncogênico ao comparar-se com os já descritos na literatura, pois a LCR parece mudar o destino da infecção viral.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Sequenciar a região LCR do HPV 16 detectado em amostras de pacientes com lesão de colo de útero.

3.2 Específicos

- Identificar, pelo BLAST, as regiões regulatórias de LCR;
- Identificar a variante do HPV 16;
- Relacionar a variante do HPV 16 com a lesão das pacientes estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo, transversal, que visou detectar a variante de HPV 16 em amostras de pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas atendidas na FCECON-AM, no período de janeiro a julho de 2006.

4.2 Amostras

As amostras analisadas foram obtidas em projetos de pesquisa anteriores envolvendo o estudo do HPV 16 (n=80) e consistem em DNA genômico isolado de esfregaços endocervicais. Este material encontra-se sob tutela do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas – LDM/CAM/UFAM, e está armazenado a -20° C.

Como as amostras provem de esfregaços endocervicais de mulheres da região Norte, seria necessário submeter o presente trabalho à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisas – CEP, competente a esta região. Contudo, este projeto se insere em um projeto de maior escala, intitulado “Análise Genômica de Vírus Isolados na Amazônia”, e que tal projeto já fora aprovado pelo CEP competente a esta região (CAAE nº. 0074.0.115.114-07) (ANEXO A).

Para obtenção destas amostras, foi coletado o material cervical de mulheres participantes de estudos passados, totalizando 80 mulheres.

4.3 Critérios de Elegibilidade

4.3.1 Critérios de Inclusão

Amostras positivas para HPV 16

Amostras positivas para DNA genômico.

Pacientes com diagnóstico histopatológico de lesão pré-maligna ou maligna do colo do útero.

4.3.2 Critérios de Exclusão

Amostras negativas para DNA genômico.

Amostras esgotadas, que não tinham quantidade suficiente para análise.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Coleta

As amostras foram coletadas da endocérvice das mulheres participantes com escova cervical descartável tipo *cito-brush*, sendo transferidas para um microtubo descartável de 1,5 mL contendo 400 µL de solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM), o qual foi hermeticamente fechado. As

amostras foram mantidas em banho de gelo até serem encaminhadas, no mesmo dia da coleta, ao Laboratório de Diagnóstico Molecular, no Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sendo armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA e execução dos procedimentos da PCR.

4.4.2 Procedimentos para amplificação da Longa Região de Controle (LCR)

As etapas executadas no laboratório de Diagnóstico Molecular estão organizadas no fluxograma a seguir (Figura):

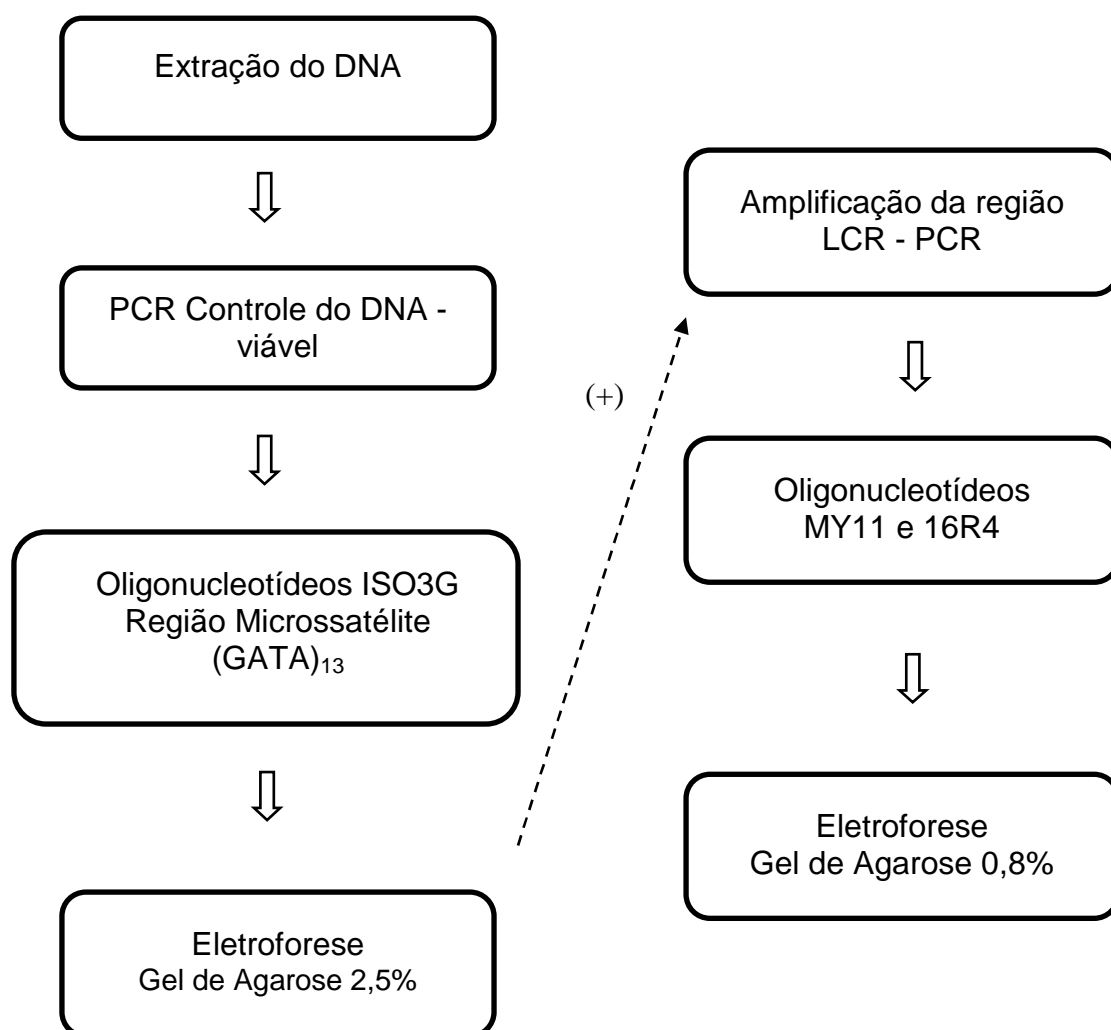


Figura 2. Fluxograma das etapas realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular – CAM – UFAM.

4.4.2.1 Extração do DNA

As amostras mantidas a -20°C foram colocadas à temperatura ambiente para a posterior execução da extração do DNA. Para a extração do DNA, foram adicionados $400\mu\text{L}$ da solução Tampão Proteolítico (TPK) em cada microtubo de cada amostra para digestão de grande parte das proteínas presentes. A solução de TPK consistiu em uma mistura de $900\mu\text{L}$ de TE, $100\mu\text{L}$ de Tween 20 a 20% e $20\mu\text{L}$ de proteinase K 10 mg/mL . Essa mistura foi levada ao banho-maria a 55°C por 1 hora e depois fervida por 10 minutos (BAUER; MANOS, 1998).

As amostras contendo sangue foram submetidas à extração por fenol-clorofórmio, onde foi adicionado $400\mu\text{L}$ de Fenol Hidratado a $400\mu\text{L}$ de cada amostra que já havia sido previamente digerida com proteinase K, então se homogeneizou suavemente por 10 minutos seguidos de 10 minutos de centrifugação a 12.000 rpm . Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se $400\mu\text{L}$ de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1), homogeneizou-se essa mistura por 10 minutos, seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, coletou-se o sobrenadante e foi adicionado $400\mu\text{L}$ de Clorofórmio Hidratado 1:1, então agitou-se as amostras por 10 minutos seguida de uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, coletou-se o sobrenadante e adicionou-se $1/10$ (10%) do volume do sobrenadante de NaCl 3M e $1000\mu\text{L}$ de Etanol Absoluto gelado. Por fim, as amostras foram precipitadas a -20°C por 12 horas.

No dia seguinte, pegou-se o material precipitado e centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 minutos, descartando o sobrenadante cuidadosamente.

Lavou-se o sedimento de DNA (pellet) com 500 μL de Etanol a 70% gelado, centrifugou a 8.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, foi descartado o sobrenadante cuidadosamente. Após centrifugação, secou o sedimento por aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e, por fim, ressuspendeu-se o sedimento de DNA com 50 μL de água Milli-Q.

Após o procedimento de extração, as amostras foram processadas para o diagnóstico molecular ou mantidas a -20°C .

4.4.2.2 Amplificação controle do DNA

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado nas amostras para as reações de PCR, foi utilizado um par de oligonucleotídeos, amplificando uma região microsatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano – ISO3G (PONTES, 2003).

O sistema de reação foi composto de:

Reagentes	Volume
Água ultrapurificada	2,2 μL
Tampão da enzima 5X	2,5 μL
dNTP 2,5 mM	2,5 μL
MgCl ₂ 25 mM	2,5 μL
Primer ISO 3G (265pb)	5,0 μL
<i>GOLD Taq</i> DNA polimerase 5U/ μL	0,3 μL
DNA	5,0 μL
Volume final	20 μL

As reações de PCR foram realizadas com 40 ciclos de amplificação em aparelho *Verite 96 Well thermal cycler - Applied Biosystems*, conforme o seguinte programa: quarenta segundos à 94°C para desnaturação, um minuto à 62°C para anelamento e um minuto e trinta segundos à 70°C para a síntese. Após os 40 ciclos, seguiram-se por uma hora a 60°C para extensão.

Após a amplificação com ISO3G, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5 % (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 100 pb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas correspondentes a 265 pb (PONTES, 2003) foram reveladas por luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

4.4.2.3 Oligonucleotídeos (*Primers*)

Para a amplificação da Longa Região de Controle do HPV 16, a reação de PCR utiliza o par de oligonucleotídeos MY11 e 16R4 (BAUER, MANOS, 1998). O iniciador 16R4 foi desenvolvido anteriormente por Barbosa-Filho (2009) e ainda não foi publicado, por isso sua sequência ainda não foi divulgada.

OLIGONUCLEOTÍDEOS

SEQUÊNCIA (5' – 3')

MY11

GCMCAGGGWCTATAAYAATGG

4.4.2.4 Amplificação da região LCR por PCR

A reação de PCR foi processada no equipamento *Verite 96 Well thermal cycler - Applied Biosystems*. O sistema para a PCR foi composto por 2,5 µL de DNA da amostra; 2,5 µL do tampão 10x; 1,0 µL de MgSO₄ (50 mM), 2,5µL do *primer forward* MY11 (5 pmol); 2,5 µL do *primer reverse* 16R4 (5 pmol); 0,5 µL de dNTP 10 mM; 0,2 µL de *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* 5U/µL e 13,3 µL de água Milli-Q para completar o volume final de 25 µL. Para controle da reação, foi utilizado um branco de reagentes (água Milli-Q) e um controle positivo com uma amostra positiva para HPV 16 (sequenciada) do banco de amostras do Laboratório de Diagnóstico Molecular, CAM, UFAM.

O equipamento foi programado para executar o seguinte termociclo:

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Pré-desnaturação	94°C	1 minuto	
Desnaturação	94°C	30 segundos	} 40 CICLOS
Anelamento	57°C	30 segundos	
Extensão	68°C	2 minutos	
Extensão final	68°C	2 minutos	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Tempo indefinido	

Terminada a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

- Eletroforese em gel de agarose 0,8%

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) em tampão TEB (Tris borato e EDTA) 1x, com marcador *ladder* múltiplo de 1Kb da *Invitrogen Life Technologies*. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (1,0 µg/mL) por vinte minutos, onde as bandas coradas que correspondem a 1992 pb foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas.

4.5 Purificação do DNA amplificado

O produto amplificado por PCR, que corresponde a 1992 pb, foi recortado do gel de agarose a 0,8% e submetido à purificação em colunas “QIAquick® PCR Purification Kit - QIAGEN”, para posterior sequenciamento, conforme o seguinte procedimento: 1) em um tubo de 600 µL, adicionou-se 35µL da amostra amplificada e acrescentou-se 175 µL de solução de ligação (5 vezes o volume da amostra); 2) colocou-se esta mistura na coluna de purificação e centrifugou-se por 50 segundos; 3) o tampão, que passa pela coluna contida no tubo suporte, foi descartado após a centrifugação; 4) nesta mesma coluna, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem e centrifugou-se por mais 50 segundos; 5) descartou-se o volume centrifugado, contido no tubo suporte da coluna, e centrifugou-se por mais 50 segundos a fim de retirar o excesso de álcool; 6) trocou-se o tubo suporte da coluna por um microtubo limpo, com capacidade para 1,5 mL e adicionou-se 30 µL do tampão de eluição no centro da coluna, e deixou-se embeber por 2 minutos; 7) centrifugou-se por

2 minutos; 8) o produto centrifugado constituiu-se do material purificado desejado.

Nestes procedimentos, utilizou-se uma microcentrífuga “Eppendorf-Centrifuge 5410” e as centrifugações procederam a 12.000g. Do volume de 30 μL eluído, retirou-se 3 μL para análise por meio de eletroforese, em gel de agarose. A amostra foi preparada adicionando-se aos 3 μL , 5 μL de água e 2 μL de tampão de corrida TEB 5X. O restante do material purificado pode ser utilizado para fins de determinação da sequência nucleotídica da amostra pelo método de sequenciamento automático.

4.6 Clonagem em *Escherichia coli* com o produto de PCR

Após a purificação, o DNA amplificado foi inserido em vetor de clonagem TOPO TA *Cloning*[®] Kit (*Invitrogen Life Technologies*). Resumidamente, a Figura 3 apresenta o roteiro do trabalho de clonagem para sequenciamento:

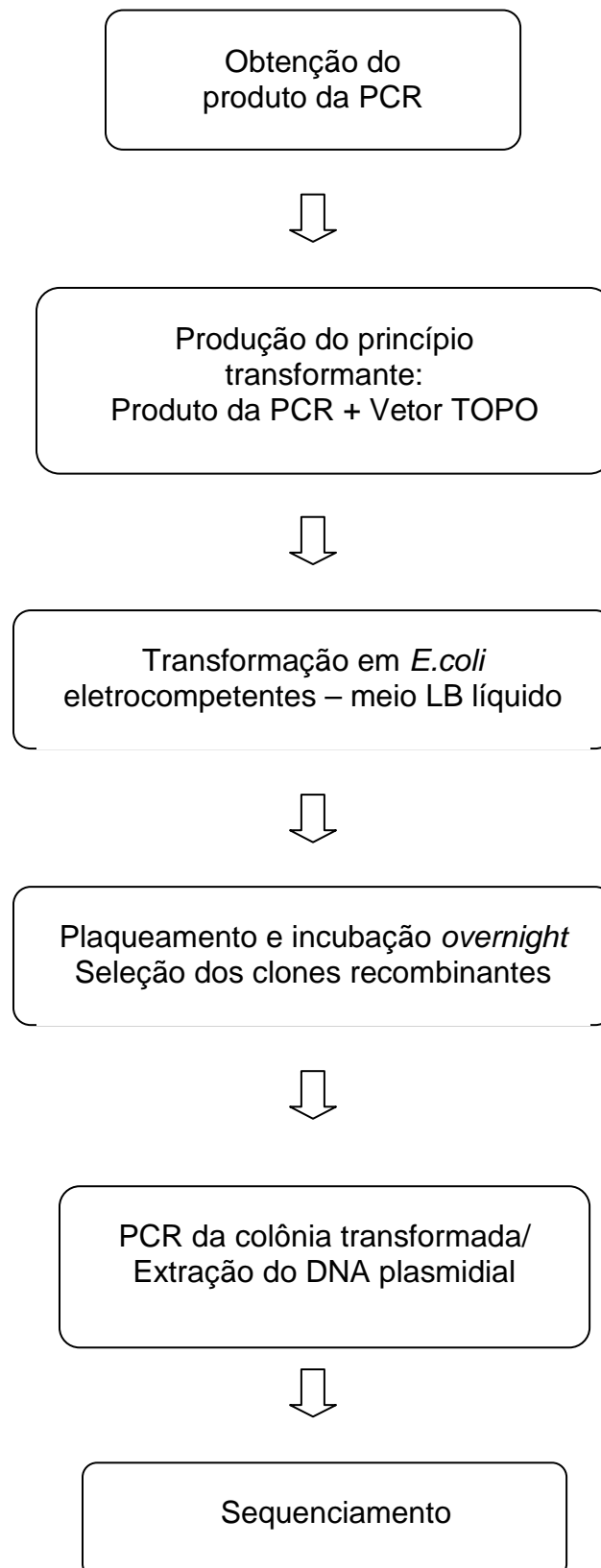


Figura 3 - Roteiro de clonagem para sequenciamento do DNA purificado.

O vetor de clonagem foi fornecido na forma linear de sua estrutura, contendo em cada extremidade 3' um resíduo de timidina formando uma extremidade *stick end* em ambas as extremidades da molécula. Como a enzima *Taq* DNA polimerase utilizada nas reações de PCR deixou resíduos de adenosina na extremidade 3' do produto amplificado, o nucleotídeo timina da extremidade 3' do vetor pôde se ligar especificamente à adenosina do DNA purificado e a Topo isomerase, ligada a cada extremidade do vetor linearizado, estabeleceu a ligação entre o produto da PCR e o vetor de clonagem. O sistema de ligação do DNA ao vetor de clonagem constituiu-se de: 2,0 µL de tampão 2X; 1,0 µL do vetor TOPO 50,0 ng/µL; 2,0 µL do produto purificado e; o volume necessário para completar 6,0 µL de água MilliQ livre de nucleases. A ligação ocorreu durante um período de 10 minutos a 4°C.

Foram utilizados 2,0 µL do sistema de ligação para transformar, por eletroporação, 50,0 µL de células de *E. coli*, linhagem TOPO10 eletrocompetentes (*Invitrogen Life Technologies*). Os 52 µL do sistema foram aplicados em cuveta própria para eletroporação e levados ao eletroporador, programado para uma voltagem de 1.900 V (necessária para provocar a formação de microporos na membrana plasmática da bactéria). As células transformadas foram imersas em 1,0 mL de meio LB líquido e incubadas por 1 hora a 37°C em estufa com agitação de 170 Rpm, para induzir a expressão de genes de resistência ao antibiótico ampicilina. A seleção das colônias transformadas foi realizada através de placas de Petri contendo 25 mL de meio LB-ágar com antibiótico ampicilina a 100 µg/mL, além de PCR direta das colônias transformadas, selecionando-se uma colônia transformada para imergi-la diretamente no sistema de PCR. A PCR utilizou 15,5 µL de água

destilada e autoclavada; 0,5 μL de enzima *Taq Platinum* DNA polimerase de alta fidelidade (*High Fidelity*) 5 unidades/ μL ; 0,5 μL de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 10 mM; 2,5 μL de cada um dos iniciadores com concentração inicial de 5 pM; 1,0 μL de sulfato de magnésio (MgSO_4) 50 pM e; 2,5 μL do tampão da enzima a 10X.

O termociclo da PCR de colônias foi realizado nas seguintes condições: 94°C, por 2 minutos, para pré-aquecimento; 94°C, por 1 minuto, para desnaturação; 57°C, por 1 minuto, para o anelamento; 68°C, por 1 minuto, para extensão; Repetir 39 vezes, a partir da desnaturação, até a extensão; 68°C, por 5 minutos, para extensão final e; 4°C, até a retirada do termociclador. Após a verificação por PCR da presença do inserto, os plasmídios das colônias transformadas foram extraídos utilizando-se o kit de purificação *Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*, seguindo as instruções do fabricante.

4.7 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, utilizou-se o seguinte sistema: 2,5 μL – 4 μL do DNA; 2,0 μL do pré-mix *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems*; 1,0 μL de um dos iniciadores (*Forward* ou *Reverse*); 5 μL de água Milli-Q para completar o volume final de 10 μL . O sistema será, então, levado ao termociclador *Mastercycler Gradient da Eppendorf®*, programado para realizar o seguinte termociclo:

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO	
Pré-desnaturação	95°C	25 segundos	
Desnaturação	95°C	15 segundos	} 29 CICLOS
Anelamento	50°C	20 segundos	
Extensão	60°C	1 minuto	
Extensão final	60°C	1 minuto	
Manutenção/ <i>Hold</i>	4°C	Tempo indefinido	

Seguindo-se a etapa de incubação, houve a centrifugação a 4.000g por quarenta minutos, a 4°C em centrífuga refrigerada “Eppendorf 5804R”. O sobrenadante foi descartado. Foram, então, adicionados 120 µL de etanol 70% seguidos de agitação por alguns segundos. A placa foi centrifugada a 4.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado, seguindo-se a uma nova centrifugação, com a placa invertida, a 700g por alguns segundos. Deixou-se a placa secar no fluxo laminar, por 15 minutos, até que o etanol evaporou completamente. O DNA foi, por fim, ressuspenso em 10 µL de *loading buffer* (tampão de lavagem composto por formamida a 70% e EDTA 1mM). A placa foi vedada e agitada vigorosamente por dois minutos para, então, centrifugá-la, a 700g por alguns segundos.

4.7.1 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador automático “MegaBACE 1000 (*Amersham Biosciences*)”. Para a injeção das amostras no aparelho utilizou-se 3kV por 80 segundos; a corrida processou-se, a 6kV, por 300 minutos, sob uma temperatura de 44°C (SANGER et al., 1977).

Ao final de todo sequenciamento, foi feita a montagem das regiões sequenciadas, bem como a análise destas sequências, a partir de comparações com outras sequências de HPV depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O método de Altschul et al. (1997) foi utilizado para o alinhamento de múltiplas sequências. A qualidade das sequências foi analisada pelo programa PHRED. O alinhamento das sequências foi feito utilizando-se a ferramenta ClustalW, disponível no programa BioEdit, que permite editar as sequências de forma a disponibilizá-las para um alinhamento linear exato, possibilitando a visualização de eventuais dissimilaridades entre elas (potenciais mutações).

4.8 Análise dos Dados

A identificação da região LCR foi realizada através de análise pela ferramenta ClustalW do programa BioEdit, cujos resultados foram agrupados e relacionados com as variantes depositadas no GenBank do NCBI através da ferramenta BLAST. Tais variantes foram relacionadas com as lesões das pacientes e apresentadas em tabelas e gráficos.

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade das amostras

A Figura 4 mostra um perfil dos resultados de PCR com ISO 3G, no qual se observa os fragmentos correspondentes a aproximadamente 265 pb, pertencentes ao gene da golgina humana, localizado no loco 15q13.3 do cromossomo 15, indicando viabilidade das amostras.

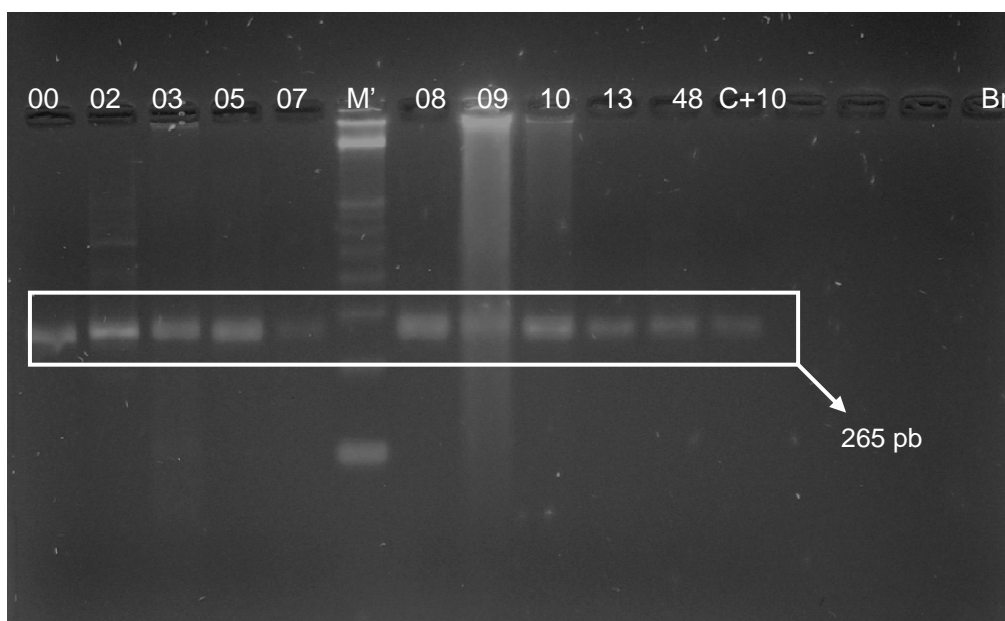


Figura 4. Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio dos produtos amplificados por PCR para diagnóstico molecular de DNA genômico, utilizando o iniciador ISO 5pmol, que amplifica um fragmento de 265 pb.

5.2 Amplificação da Longa Região de Controle

Após a PCR para amplificação da Longa Região de Controle do HPV 16, com os oligonucleotídeos MY11 e 16R4, pode-se observar fragmentos equivalentes a 1992 pb, como observado na Figura 5.

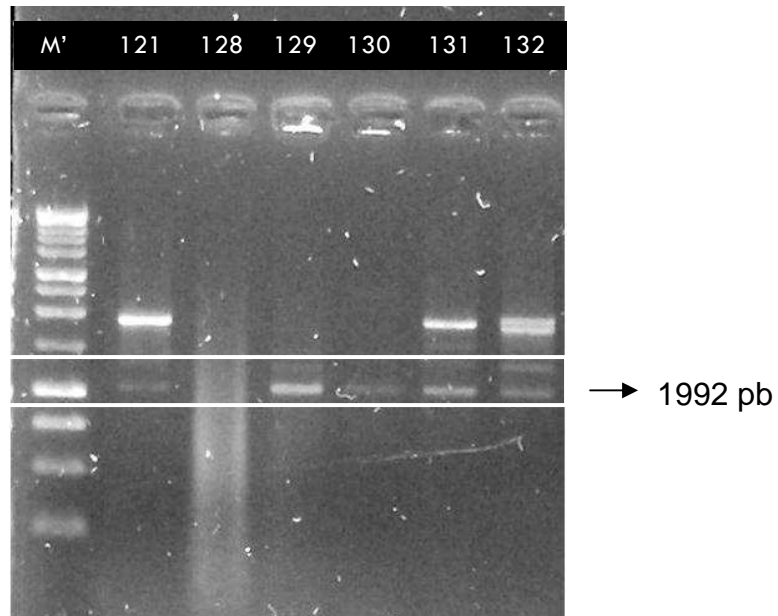


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR para amplificação da região LCR, utilizando os iniciadores MY11 e 16R4, que amplificam um fragmento de 1992 pb.

5.3 Gel de Purificação

Ao termino de cada purificação feita em colunas “QIAquick® PCR Purification Kit – QIAGEN”, realizou-se procedimentos de eletroforese em gel de agarose a 0,8% para verificar a viabilidade e integridade da Longa Região de Controle. Pode-se observar, na Figura 6, os fragmentos correspondentes a 1992 pb recortados do gel dos produtos da PCR para amplificação da LCR. As amostras encontraram-se viáveis após purificação.

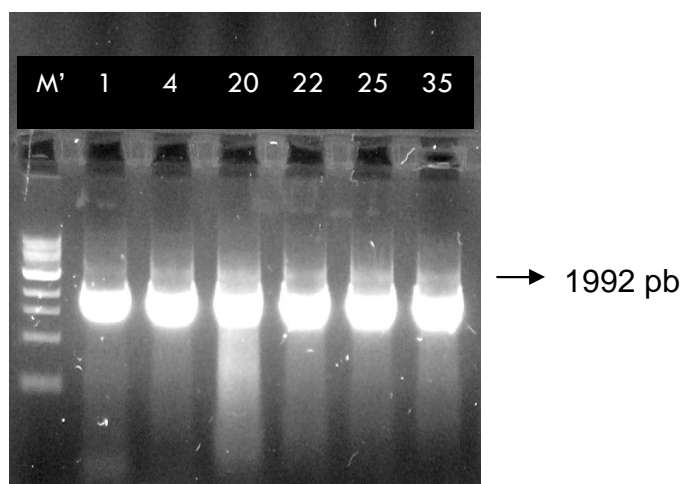


Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR para amplificação da região LCR, após purificação.

5.4 Clonagem

Devido a falha no sequenciador MegaBACE, não foi possível realizar o sequenciamento das amostras e, conseqüentemente, obter as variantes do HPV 16 que infectaram as pacientes estudadas com lesões pré-malignas e malignas do colo do útero atendidas na FCECON.

Porém, das 80 amostras, a clonagem foi possível em 21 amostras. Em relação às outras 59 amostras, estas não foram clonadas devido à baixa qualidade das bandas na PCR (bandas inespecíficas) e algumas amostras foram esgotadas durante a repetição dos procedimentos. Como o material disponível para o projeto era limitado, a amostragem foi restringida para verificar se haveria sucesso no sequenciamento das 21 amostras e, caso positivo, poder-se-ia seguir a clonagem para as outras amostras. Porém, como não foi possível sequenciar as amostras e o tempo para realização do presente projeto se esgotou, não foi possível ampliar o número das clonagens.

Para clonagem das 21 amostras, os fragmentos de DNA foram ligados no vetor de clonagem TOPO e então inseridos em *E.coli*, pela transformação por eletroporação.

Para que as bactérias transformadas adquirissem resistência ao antibiótico ampicilina (100 µg/µl), foi necessário incubá-las por 2 horas. Após a incubação, as colônias foram plaqueadas em meio LB sólido e ampicilina e colocadas em *overnight*.

Os plasmídios recombinantes foram então extraídos e analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, como pode ser observado nas Figuras 7 e 8.

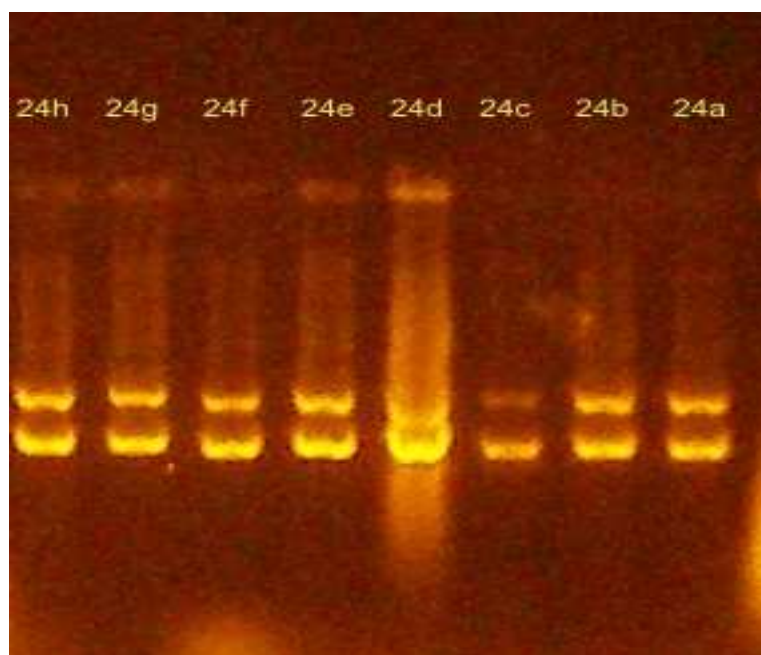


Figura 7. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR de plasmídios recombinantes.

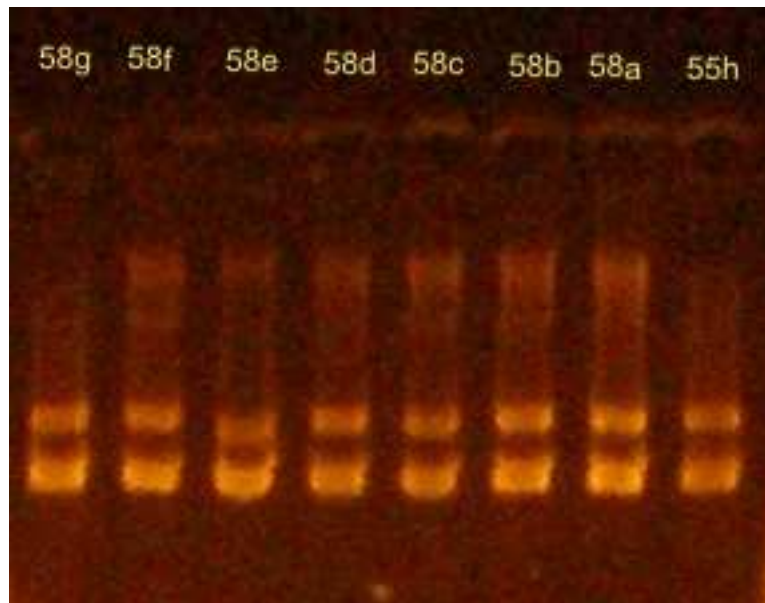


Figura 8. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, dos produtos da PCR de plasmídios recombinantes.

Pode-se observar que, das pacientes com este tipo de DNA-vírus, a lesão predominante foi Lesão Intra-epitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL), com 74% (Gráfico 1), que são alterações precursoras ao câncer cervical e causadas principalmente por HPV, além de outros fatores.

Com 15%, o carcinoma invasor é o segundo tipo de lesão mais predominante entre as pacientes estudadas, logo em seguida vem a Lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), com 10%, e ainda pode-se observar em 1% das amostras, adenocarcinoma, um tipo raro de lesão maligna, de baixa frequência.

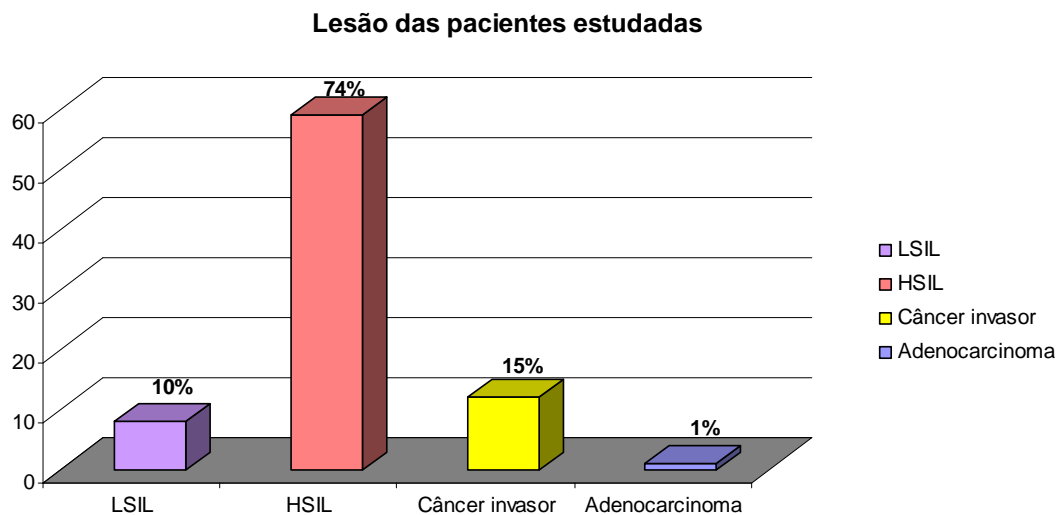


Gráfico 1. Tipos de lesão do colo do útero das 80 pacientes positivas para HPV 16.

5.6 Faixa Etária

As pacientes do presente estudo se encontram na faixa etária dos 23 aos 73 anos, com predominância de 29 (36%) mulheres no intervalo de 31 a 40 anos, conforme o Gráfico 2.

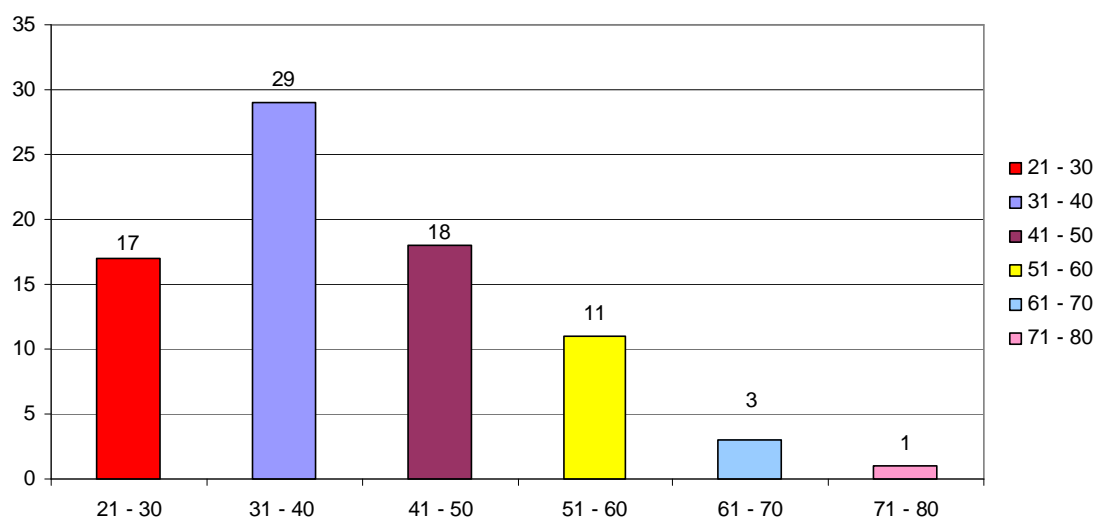


Gráfico 2. Distribuição das mulheres em estudo quanto à faixa etária.

A média de idade das pacientes estudadas apresentou-se, de acordo com cada lesão, conforme a Tabela 4.

Lesão	Média de idade
LSIL	34 anos
HSIL	39 anos
Câncer invasor	47 anos
Adenocarcinoma	51 anos

Tabela 4: Média de idade das pacientes com lesões cervicais pré-malignas ou malignas e portadoras do HPV 16.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, conseguiu-se amplificar a Longa Região de Controle de 80 amostras positivas para HPV 16 com lesão pré-maligna e maligna do colo do útero, porém apenas 21 destas foram clonadas e, devido à falha no sequenciador, não se pode obter um resultado conclusivo de quais variantes da Longa Região de Controle de HPV 16 infectam as pacientes do presente estudo, todas oriundas da região Amazônica.

A identificação das variantes do HPV 16 pode ser relevante para o desenvolvimento de um diagnóstico, da conduta terapêutica e de estratégias de vacina (WHEELER et al., 2008).

As PCR realizadas com iniciadores MY11 e 16R4 especificamente desenvolvidos para amplificação da LCR de HPV 16 resultaram em amplificações de fragmentos de diversos comprimentos, que depois puderam ser purificados e observados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, mostrando a integridade e conservação da região.

O sequenciamento seria realizado a partir das purificações do produto de PCR e das extrações plasmidiais, gerando leituras analisadas pela ferramenta ClustalW do programa BioEdit. Ao final das análises iniciais de qualidade das leituras do sequenciamento, as sequências obtidas seriam agrupadas e relacionadas com outras variantes depositadas no GenBank do NCBI através da ferramenta BLAST. Essas variantes seriam relacionadas com as lesões das pacientes estudadas.

Não foi possível, dentro do tempo de desenvolvimento deste projeto, realizar o sequenciamento das variantes por problemas no Sequenciador, e os

objetivos propostos não puderam ser alcançados. Desta forma, o presente estudo se limitará a fazer um breve estudo sobre as lesões apresentadas pelas pacientes estudadas.

Nas pacientes diagnosticadas com lesões cervicais pré-malignas ou malignas e com HPV 16, pode-se observar um percentual de HSIL de 74%, de LSIL de 10% e de carcinoma cervical de 15%. O fato da discrepância bem acentuada de Lesão de alto grau para Lesão de baixo grau pode ser justificado pelo encaminhamento de pacientes com LSIL para (PAM Codajás), que é o posto especializado neste tipo de lesão e que concentraria um maior número de pacientes com estes casos, e ainda pode-se observar a presença de um caso de adenocarcinoma (1%), tipo mais raro de lesão maligna (MEDEIROS et al., 2005).

Bonilha et al. (2009), em um estudo sobre a incidência de HPV em pacientes grávidas HIV positivas, detectaram, dos diagnósticos das biópsias de 22 gestantes que tinham a associação HPV/HIV, uma frequência de 40,9% de HSIL e 59,1% de LSIL.

Derchain et al. (2005) sugerem que a infecção pelo HPV é transitória em 80% dos casos e apenas 20% das mulheres com um teste de HPV positivo apresentarão algum tipo de Lesão.

Carrilo et al. (2004) analisaram 154 amostras de pacientes mexicanas e detectaram frequência de 95,5% para HPV em casos de câncer cervical invasor, 91,6% em HSIL e 66,7% em LSIL.

Num estudo realizado por Souza et al. (2001) sobre o diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero, foi detectado, em 49 biópsias, 16 casos com displasia cervical e 26 casos de HPV. Dentre os 26 casos de

HPV, LSIL esteve associada a esse vírus em 90% dos casos e, nos casos de HSIL, em 100%. Os HPV de alto risco estavam presentes em 93,7% das displasias cervicais, e apenas um caso (6,3%) estava associado ao HPV de baixo risco. Esse estudo assemelha-se ao de Ferreira (2007), onde as pacientes com lesão cervical apresentaram alta positividade para HPV de alto risco, de onde foram retiradas as amostras para o presente estudo, ou seja, 80 amostras positivas para HPV 16.

Carvalho et al. (2005), em um estudo retrospectivo sobre a infecção pelo HPV no Rio de Janeiro, com 788 mulheres, detectaram, através da técnica de captura hídrica, HPV de alto risco em 63,2% das pacientes com LSIL e 100% com HSIL.

O presente estudo mostra que a faixa etária predominante de mulheres com lesão pré-maligna ou maligna do colo do útero compreende entre os 21 à 40 anos.

O HPV está presente em 99,7% das neoplasias cervicais e as DST são consideradas problemas de saúde pública há anos. As informações relacionadas à sua prevenção, diagnóstico e frequência são de suma importância. A qualificação de programas de controle e prevenção de DST, o diagnóstico prévio de lesões pré-malignas e malignas no colo do útero, programas de educação, atenção primária, desenvolvimento e larga distribuição de vacinas para vários tipos de HPV podem contribuir para redução nos números de neoplasia cervical, principalmente na região Norte, onde seu índice é tão alto (INCA, 2009).

8. CONCLUSÃO

- Como não foi possível executar o objetivo final proposto – sequenciamento da LCR dos HPV 16 - não se detectou quais variantes de LCR do HPV 16 infectaram mulheres da Região Amazônica, bem como não foi possível verificar se estes vírus possuíam um maior potencial oncogênico ao comparar-se com os já descritos na literatura. Porém, as outras etapas foram exaustivamente executadas, com extração do DNA das amostras, PCR e clonagem, com grande aprendizado nessas técnicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA FILHO, R. A. A. **Caracterização e análise filogenética de variantes do HPV 16 isoladas na Amazônia. 2009.** Qualificação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR detection of genital human papillomavirus. Applications – **Viral Pathogens**, p. 407-413, 1998.

BAZAN. **Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas.** 2007. Dissertação de Mestrado (Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS). 2008.

BEKKERS, R. L. M.; MASSUGER, L. F. A. G.; BULTEN, J.; MELCHERS, W. J. G. Epidemiological and clinical aspects of human papillomavirus detection in the prevention of cervical cancer. **Rev Med Virol**, v. 14, p. 95-105, 2004.

BONILHA, J. L.; YABABE, M. F.; CAMARGO, B. F.; MARTINS, E. K. L.; RIBEIRO, M. C. A.; COSTA-NETO, J. M.; GALÃO, E. A.; MOTA, M. T. O.; RAHAL, P. Incidência de HPV em colo do útero de gestantes HIV positivas atendidas no Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. **Einstein**, v. 7, p. 334-40, 2009.

BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C. L. M.; SHAH, K. V.
Review: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.
J Clin Pathol, v. 55, p. 244-265, 2002.

CARRILO, A.; MOHAR, A.; MENESES, A.; FRÍAS-MEDDIVIL, M.; SOLORZA,
G.; LIZANO, M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para
la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones
pre malignas. **Salud Pública de México**, v. 46, n. 1, 2004.

CARVALHO, M. O. O.; CARESTIATO, F. N.; PERDIGÃO, P. H.; XAVIER, M. P.
P. T.; SILVA, K. C.; BOTELHO, M. O.; OLIVEIRA, L. H. S.; CAVALCANTI, S. M.
B. Human Papillomavirus Infection in Rio de Janeiro, Brazil: a Retrospective
Study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 398-404, 2005.

DAUD, L. E. S. **Detecção e genotipagem do papilomavirus humano em
amostra do colo do útero de adolescentes do Distrito Sanitário Noroeste
do município de Goiânia, Goiás.** 2005. Dissertação (Mestrado em
Imunologia) – Curso de Pós-Graduação em de Medicina Tropical, Universidade
Federal de Goiás – UFG.

DE VILLIERS, E-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H-U.; zur
HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27,
2004.

DOORBAR, J. review: The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S7–S15, 2005.

DUIN, M. V.; SNIJDERS, P. J. F.; VOSSEN, M. T. M.; KLAASSEN, E., VO, F.; Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 317–325, 2000.

FERENCZY, A.; FRANCO, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **The Lancet**, v. 3, p. 11-16, 2002.

FERREIRA, J.R.D. **Detecção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas**. Manaus - Amazonas. 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas – FCECON – AM. **Registro Hospitalar do Câncer**. Dados dos registros de base hospitalar. Ano 2002.

GEMIGNANI, F.; LANDI, S.; CHABRIER, A., SMET, A.; ZEHBE, I.; CANZIAN, F.; TOMMASINO, M.; Generation of a DNA microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. **Journal of Virological Methods**, v. 119, p. 95–102, 2004.

GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Infecção por Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV**. Trad. Maria Alice Guimarães. Porto Alegre. Editora Artes Médicas Sul Ltda., p. 431, 1999.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Screening Group – cervical research studies**. Disponível em: <http://screening.iarc.fr/cervicalindex.php?lang=1> Acesso em: 27/01/2010.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140 Acesso em: 08/10/2005.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010. **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acesso em: 18/01/2010.

KADAJA, M; SILLA, T; USTAV, E; USTAV*, M; Papillomavirus DNA replication - From initiation to genomic instability. **Virology**, p.9, v. 6, 2009.

LIU, J.; ROSE, B.; HUANG, X.; LIAO, G.; CARTER, J.; WU, X.; THOMPSON, C. Comparative analysis of characteristics of women with cervical cancer in high-versus low-incidence regions. **Gynecologic Oncology**, v. 94, p. 803-810, 2004.

LIZANO, M.; CRUZ-HENA'NDEZ, E.; GARCIA-CARRILO, A.; GARCIA-CARRANCA, A.; LEON-ROSALES, S. P.; AS-GONZA'LEZ, A.; HENA'NDEZ-

HENA'NDEZ, D. M.; MOHAR, A.; Distribution of HPV 16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. **Gynecologic Oncology**, v.102, p.230 – 235, 2006.

MAGI, J. C.; BRITO, E. M. S.; GRECCO, E. T. O.; PEREIRA, S. M. M.; FORMIGA, G. J. S. Prevalência de Papilomavirus Humano (HPV) Anal, Genital e Oral, em Ambulatório Geral de Coloproctologia. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 26, n. 3, 2006.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Viruses and cancer**, v. 82, p. 15-33, 2001.

MEDEIROS, V. C. R. D.; MEDEIROS, R. C.; MORAES, L. M.; MENEZES FILHO, J. M.; RAMOS, E. S. M.; SATURNINO, A. C. R. D. Câncer de Colo de Útero: Análise Epidemiológica e Citopatológica no Estado do Rio Grande do Norte. **RBAC**, v. 37, n. 4, p. 227-231, 2005.

MORAROS, J.; BIRD, Y.; BARNEY, D. D.; KING, S. C.; BANEGAS, M.; SUAREZ-TORIELLO, E. A Pilot Study: HPV Infection Knowledge & HPV Vaccine Acceptance among Women Residing in Ciudad Juárez, México. **Californian Journal of Health Promotion**, v. 4, p. 177-186, 2006.

MS – Ministério da Saúde, 2000. **Câncer de colo de útero**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/cidadao/visualizar_texto.cfm?idtxt=241.

PANDE, S.; JAIN, N.; PRUSTY, B.; BHAMBHANI, S.; GUPTA, S.; SHARMA, R.; BATRA, S.; DAS, B. C. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North Índia. **Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1060 – 1066, 2008.

PILLAI, M. R., SREEVIDYA, S., POLLOCK, B. H., JAYAPRAKASH, P. G., HERMAN, B. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variants in Indian cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, n. 87, p. 268-273, 2002.

PONTES, I. M. Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos. 2003. 57f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas/ Universidade Federal de São Carlos.

QIU, D. A.; WU, E. Q.; YU, X. H.; JIANG, C. L.; JIN, Y. H.; WU, Y. G.; CHEN, Y.; CHEN, Y*.; SHAN, Y. M.; ZHANG, G. N.; FAN, Y.; ZHA, X.; KONG, W. HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China. **Gynecologic Oncology**, v.104, p. 77–85, 2007.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; OLIVEIRA, E. Z.; ALDRIGHI, J. M.; MARIANI NETO, C. Detecção sorológica anti-HPV 16 e 18 e sua associação com os achados do papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens. **Rev Assoc Med Brás**, v. 52, n. 1, p. 43-7, 2006.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJANEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Rev Saúde Pública**, v. 42, n. 1, p. 123:30, 2008.

RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CARLETA, H. E.; SILVA, I. S. B. Bases moleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cencerologia**, v. 47, p.84-179, 2001.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venerology**, v. 16, p. 231–140, 2002.

SATHISH, N.; ABRAHAM, P.; PEEDICAYIL, A.; SRIDHARANA, G.; SHAJI, R. V.; CHANDY, G. E2 sequence variations of HPV 16 among patients with cervical neoplasia seen in the Indian subcontinent. **Gynecologic Oncology**, v. 95, p. 363–369, 2004.

SCHIFFIMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; HILDESHEIM, A.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A. C.; BRATTI, M. C.; SHERMA, M. E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; WRIGHT, T. C.; SOLOMON, D.; CHEN, Z. SCHUSSLER, J.; CASTLE, P. E.; BURK, R. D. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, p. 76-84, 2005.

SCHACHTER, J.; STAMM, W. E. ***Chlamydia***. In: **Manual of clinical microbiology**. 7ed. Washington D.C.; ASM Press., p. 795-806, 1999.

SOLIMAN, P. T.; SLOMOVITZ, B. M.; WOLF, J. K. Mechanism of cervical cancer. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, p. 253-258, 2004.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D.; O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.2, p. 155-160, 2005.

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+: Acuidade da Histopatologia. **RBGO**, v. 23, n. 6, 2001.

VILLA, L. L. Human papillomavirus and cervical cancer. **Advances in Cancer Research**, v. 71, p. 321-341, 1997.

WHARTON, J. T.; TORTOLERO-LUNA, G. **Neoplasms of the Cervix**. In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R; Holland, J.F.; Frei,E. Câncer Medicine. 5th edição.Canada BCDecker inc., 2000. Disponível no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

WHEELER, C. M.; YAMADA, T.; HILDESHEIM, A.; JENISON, S. A. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variants: Identification by E6 and L1

Lineage-Specific Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 11–19, 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **State of the art of new vaccines: research & development.** Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/85/2/07-020207/en/> Acesso em: 18/01/2010.

ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Front Biosci**, v. 11, p. 2286–2302, 2006.

ZUR, HAUSEN, H. Papillomaviruses infections - a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, p. 55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. **Nature Publishing Group**, v. 2, 2002.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 0074.0.115.114-07, intitulado: “**Análise Genômica de Vírus Isolados na Amazônia**”, tendo como Pesquisadora Responsável Cristina Borborema dos Santos.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 26 de abril de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM

Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora