



**UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**



MARINA ANCHIETA BITUN

**ANÁLISE EM AMOSTRAS GLANDULARES CERVICO-VAGINAIS DA
PRESENÇA DE HPV**

São Paulo
2018



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA



MARINA ANCHIETA BITUN

**ANÁLISE EM AMOSTRAS GLANDULARES CERVICO-VAGINAIS DA
PRESENÇA DE HPV**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Éder de Carvalho Pincinato

São Paulo
2018

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
primeiramente ao Criador e
Senhor da minha vida.
“... I will remember, You are
the reason of my life”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, o Senhor e Salvador da minha vida, sem Ele nada teria sentido. O Teu amor cobre as minhas fraquezas e a Tua fidelidade é maior do que todos os obstáculos na minha vida!

À Universidade Presbiteriana Mackenzie e principalmente ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), pela formação de qualidade e pelas experiências adquiridas durante todos esses anos.

Ao querido orientado e professor Éder, pelas oportunidades concedidas, conhecimentos compartilhados, conversas e amizade. Agradeço por toda paciência e confiança a mim creditadas durante todo esse período. Meu muito obrigada!

À querida professora Ana Paula, que com seu entusiasmo tornou os dias longos e exaustivos no laboratório, mais leves e animados. Todas as conversas, conselhos e conhecimentos (que são muitos, diga-se de passagem!) me fizeram acreditar e crescer profissionalmente e pessoalmente. Obrigada por acreditar em mim!

Agradeço a professora Ieda Sonehara, dona de um coração extremamente generoso! Com toda certeza, a senhora não tem dimensão do quanto cada mensagem no celular, cada conversa, cada café, cada email foram significativos no meu crescimento pessoal, primeiramente e profissional. O carinho e admiração que desenvolvi durante esses anos, ficarão marcados para sempre, porque a senhora foi extremamente relevante na minha vida, como professora e pessoa, alguém que entendeu o papel da sua profissão na integralidade. Obrigada por acreditar em mim, e me estimular nos momentos de desânimo! Só posso deixar registrado o meu muitíssimo obrigado! A senhora é muito especial, e tem o meu respeito e admiração!

Aos meus amigos, pelas conversas, risadas, brincadeiras, conselhos, apoio nos momentos de dificuldades, pelas brigas dos trabalhos em grupo, e por serem pessoas tão especiais. Muito obrigada!

À minha melhor amiga Fernanda Lemes, que dividiu comigo alegrias e tristezas, durante todo esse período. Só posso agradecer pela parceria, você foi um presente de Deus para esse tempo de altos e baixos, e que levarei para a vida. Esses anos de convivência foram especiais, e levarei para sempre. Te amo

cabeça de pato.

Ao meu amigo Gustavo Ariel, que com toda paciência e carinho, se tornou alguém especial, ganhando um espaço generoso no meu coração! Cada conversa, cada outback, cada abraço, cada momento foi especial, e eu vou sentir muita falta! Amo você, Guga!

À minha querida mãe, que sempre olhou para a vida acreditando que ela tem muito a oferecer e que ela vale a pena, sem me deixar desanimar e parar. Só posso agradecer por toda paciência, amor e dedicação pela minha vida. Sua vida me inspira a querer ser melhor todos os dias! Te amo mamusca!

Ao meu querido pai, que possui o maior coração que conheço. Eu te amo, e só posso agradecer por ser esse homem incrível e temente a Deus. Você é um exemplo para mim. Te amo gordinho!

Ao meu amado irmão, que consegue transformar os dias mais tediosos e desanimadores, em momentos especiais e singulares. Meu parceiro de vida. Obrigada por sempre estar por perto, me protegendo e cuidando de mim. Meu orgulho! Eu te amo demais!

À minha amada e querida Tuca, não tenho palavras para expressar o que sinto por você! Tenho muito orgulho em ser sua neta. Só posso agradecer por tudo que passamos juntas, conversas, telefonemas, abraços, carinhos e os eternos cafés da tarde recheados de tudo menos comida, rs! Só posso agradecer a Deus pela sua vida, sou muito privilegiada! Amo você para sempre!

RESUMO

O Papilomavírus humano é o vírus que causa a doença sexualmente transmissível mais comum e frequente da atualidade, levando a preocupação mundial, pelo fato de sua correlação com o câncer. Após duas décadas de descoberta, estimativas recentes indicam que infecções pelo HPV, são responsáveis por aproximadamente 500.000 casos de câncer e associados a 275.000 casos de morte, anualmente, justificando a realização deste trabalho, que teve por objetivo detectar e genotipar o HPV de alto e baixo risco oncológico em amostras da cérvix uterina de pacientes com diagnóstico citológico de células glandulares atípicas. Para atingirmos estes objetivos, as amostras biológicas foram coletadas em meio líquido, seguida de extração de DNA por kit comercial (Promega) e a detecção e genotipagem do HPV foi realizada por Nested Multiplex PCR (NMPCR). De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras analisadas apresentaram pelo menos 1 tipo de HPV. O tipo de HPV mais frequente foi o 18 (100%) e menos frequente foi o 33 (28,6%). Portanto, conclui-se que houve uma alta prevalência do HPV, principalmente os de alto risco oncogênico, o que contribui para um prognóstico desfavorável das pacientes estudadas. Estes resultados devem ser futuramente confirmados e mais pacientes devem ser incluídos, a fim de confirmar os dados apresentados neste trabalho.

Palavras chaves: Papilomavírus humano (HPV), Nested Multiplex PCR, câncer do colo do útero, alto e baixo risco oncológico.

ABSTRACT

The human papillomavirus is the most common and frequent sexually transmitted disease today, leading to worldwide concern, because of its correlation with cancer. After two decades of discovery, recent estimates indicate that HPV infections are responsible for approximately 500,000 cases of cancer and associated with 275,000 cases of death annually, justifying the accomplishment of this work, which aimed to detect and genotype the HPV of high and low oncological risk in samples of the uterine cervix of patients with cytological diagnosis of atypical glandular cells. To achieve these objectives, the biological samples were collected in liquid medium, followed by DNA extraction by commercial kit (Promega) and HPV detection and genotyping was performed by Nested Multiplex PCR (NMPCR). According to the results obtained, all samples analyzed showed at least 1 type of HPV. The most frequent type of HPV was 18 (100%) and less frequent was 33 (28.6%). Therefore, it was concluded that there was a high prevalence of HPV, especially those with high oncogenic risk, which contributes to an unfavorable prognosis of the patients studied. These results should be confirmed in the future and more patients should be included in order to confirm the data presented in this study.

Key words: Human papillomavirus (HPV), Nested Multiplex PCR, cancer of the cervix, high and low cancer risk.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	11
3.1	Objetivo geral	11
3.2	Objetivo específico	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Local de estudo	12
3.2	Aspectos éticos	12
3.3	Coleta do material	12
3.4	Extração de DNA	13
3.5	PCR	14
3.6	Eletroforese	15
4	RESULTADOS	16
4.1	Extração e quantificação de DNA	16
4.1	Controle de qualidade da reação	18
4.1	Deteccção e genotipagem do HPV	19
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano é o vírus sexualmente transmissível mais comum e frequente da atualidade, levando a preocupação mundial, pelo fato de sua correlação com o câncer (NADAL et al., 2009). O HPV (Papilomavírus humano) é um DNA vírus, que infecta pele e mucosas nos mais diversos locais do corpo humano. Pode causar diversos tipos de lesões, como verrugas naturais e verrugas genitais, as condilomatoses (MAGALHÃES et al., 2017).

O câncer é um termo genérico usado para agrupar um grande número de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Também pode ser chamado de tumor maligno ou neoplasia. A característica que o define é a rápida proliferação de células anormais que crescem além dos limites habituais, e que podem invadir tecidos adjacentes e se alojarem em outras partes do corpo, este último processo é designado metástase (WHO, 2015). Hábitos de vida deletérios como: o fumo, a vida sedentária, a dieta rica em alimentos gordurosos e/ou pobre em fibras alimentares, associados aos fatores genéticos, podem levar ao desenvolvimento do câncer (PELUCCHI e cols., 2009).

O câncer do colo do útero é a segunda causa de morte por câncer nas mulheres adultas (PRASAD, 2009). Em alguns países em desenvolvimento, onde as barreiras de acesso à prevenção do mesmo são muito grandes, este tipo de câncer é o mais comum entre as mulheres, devido ao fato destas regiões serem pouco acessíveis e pobres em recursos (PRASAD, 2009; FOERSTER e MURTAGH, 2005; SASLOW et al., 2007).

O HPV e o câncer de colo de útero estão sempre sendo relacionados nos dias de hoje, porém essa associação passou a ser feita apenas no ano de 1949, por conta de um exame que o patologista George Papanicolaou introduziu na sociedade, e que é utilizado até hoje. O conhecido exame chamado de Papanicolau, possibilitou identificar as alterações celulares pré-malignas, que eram associadas as mulheres que tinham atividade sexual e o posterior desenvolvimento do câncer de colo de útero (NAKAGAWA et al., 2010).

Na década de 1970, a correlação entre o câncer de colo de útero e o HPV se aproximavam ainda mais, com o conhecimento etiológico da doença sendo descoberto pelo infectologista alemão, Harold zur Hausen. Anos mais tarde, na década de 90, com a tecnologia molecular mais avançada, foi possível identificar

o DNA do Papilomavírus humano em amostras de tecidos de carcinomas cervicais. E com isso a tese de que “A infecção pelo vírus HPV é causa necessária para o desenvolvimento do carcinoma invasivo”, foi conhecida e aceita no mundo (NAKAGAWA et al., 2010).

Após duas décadas de descoberta, estimativas recentes indicam que infecções pelo HPV são responsáveis por aproximadamente 500.000 casos de câncer e associados a 275.000 casos de morte, anualmente (INSINGA et. al., 2009).

Além do câncer cervical, existem outras formas de lesões como as verrugas genitais e as lesões pré-cancerosas do trato anogenital masculino e feminino, câncer de cabeça e pescoço. Os homens são a principal fonte de transmissão da infecção as mulheres, isso ocorre porque diferentemente das outras DSTs, o vírus é transmitido mais facilmente do homem para a mulher do que o oposto. Juntamente a isso, em algumas cidades do Brasil, a incidência de câncer anal e peniano é a maior do mundo (ZARDO et al., 2013).

A contaminação e infecção pelo vírus ocorre principalmente na adolescência, com mulheres ativas sexualmente até vinte e cinco anos de idade (NADAL et al., 2009). A predominância tem sido alta desde 1960, e as perspectivas são de que 75% a 80% da população seja contaminada até o fim da vida. Esses números estão crescendo por diversos motivos, dentre eles o aumento do número de parceiros sexuais, prática do uso de anticoncepcionais orais e diminuição de outros meios de prevenção (MAGALHÃES et al., 2017). Além desses, existem alguns cofatores que estão associados ao aumento do desenvolvimento de câncer genital, como o alto número de gestações, tabagismo e outras doenças sexualmente transmissíveis, como o HIV e clamídia (MELO et al., 2009).

Entretanto, com o tempo, os avanços tecnológicos foram evoluindo e com isso os exames para diagnósticos ficaram mais acessíveis, possibilitando um número maior de pessoas a se submeterem aos exames, percebendo o número alto de contaminação e conseqüentemente de desenvolverem a neoplasia (MAGALHÃES et al., 2017).

O diagnóstico da infecção pelo HPV pode ser dividido em três formas clássicas: clínica, subclínica e latente. No primeiro tipo de infecção conseguimos

detectar a olho nu, no exame clínico, a partir da aparição de verrugas. No segundo tipo de infecção, que é a mais comum no colo do útero e que corresponde a 80% dos casos, detectamos pelo uso do colposcópico, citologia ou histologia. E por fim, no último tipo de infecção, identificamos a partir de exames de biologia molecular. A partir do diagnóstico, são feitas biopsias para que sejam identificados os tipos do HPV (MAGALHÃES et al., 2017). A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) é a maneira mais utilizada na identificação e amplificação do DNA do HPV, que indica a infecção pelo vírus na célula hospedeira (ZONTA et al., 2005).

A forma clínica pode ser diagnosticada a partir do exame clínico, que é essencial para diagnosticar lesões associadas ao HPV, com o auxílio de um instrumento de amplificação, sendo a maioria das lesões identificadas em diferentes sítios humanos (CASTRO, 2006).

Na forma subclínica, os métodos podem ser a colposcopia e o exame do Papanicolau. No colposcópico, o exame é realizado com a aplicação do ácido acético a 5%, para a visualização de áreas com epitélio acetobranco sugestivo da presença do HPV como microverrugas, micropápulas, micropontilhados, entre outras alterações do epitélio. (CASTRO, 2006).

Já o exame diagnóstico do Papanicolau, está baseado 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. Ele é capaz de detectar as alterações que o HPV pode causar nas células, como também um possível câncer, mas não é capaz de diagnosticar a presença do vírus (CARVALHO, 2009).

Atualmente, já foram identificados mais de 200 tipos de HPV e, destes, 40 infectam o trato genital feminino. São classificados de acordo com seu potencial oncogênico. Os tipos considerados de baixo risco são 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72 e 81, e causam apenas verrugas benignas. Os tipos de alto risco oncogênico são 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, por estarem recorrentemente associados as neoplasias invasoras e as NIC 2 e 3 (FERRAZ et al., 2012).

As neoplasias invasivas do colo uterino, são antecedidas por uma fase pré-invasiva da doença, isso tem como característica um conjunto de

acontecimentos que progridem da atipia celular a displasia, ou mesmo a neoplasia intraepitelial cervical, conhecida como NIC, antes da continuação ao carcinoma invasivo. A NIC pode ser apontada pelo exame microscópico em esfregaço citológico (técnica do Papanicolau), através de alterações de células individuais. Outro exame, o histológico, permite a visualização de toda extensão do tecido, permitindo uma melhor avaliação, pois é possível avaliar a diferenciação, maturação, estratificação e anomalias celulares, podendo definir o grau da neoplasia (IARC, 2017).

As neoplasias intraepiteliais cervicais, são divididas em 3 categorias, NIC 1, 2 e 3. A NIC 1 possui uma maturação adequada, com algumas anomalias nucleares mínimas, onde as células indiferenciadas se limitam a camadas mais profunda do epitélio, e com poucas representações de mitose. A NIC 2 é representada pelas alterações celulares displásicas, restritas a porção mais inferior do epitélio, com anomalias celulares mais presentes que na NIC 1, e mitoses são expressas na metade inferior do epitélio. Por fim, na NIC 3 as anomalias nucleares estão por toda a espessura do epitélio, nessa categoria, a diferenciação e a estratificação estão ausentes ou presentes apenas na porção superficial do epitélio, com presença marcante de mitoses com formas anormais (IARC, 2017).

A exposição de mulheres ao HPV é bastante frequente, em compensação a aparição da neoplasia cervical é mínima. As anomalias cervicais presentes pela infecção do HPV, não tem grande potencial de se desenvolver a uma NIC ou neoplasia de alto grau, pois uma regressão espontânea é frequentemente observada. Da infecção inicial a doença manifesta, existe um longo percurso, e por conta disso diversos cofatores se tornam necessários para a continuação da doença, dentre eles tabagismo, deficiência de micronutrientes, disfunções hormonais, entre outros (IARC, 2017).

O risco oncogênico do vírus está relacionado ao comportamento de seu genoma no interior da célula hospedeira. Os HPVs de baixo risco oncogênico tendem a manter o seu DNA íntegro, circular e episomal. Em contrapartida, os de alto risco, acabam tendo suas fitas de DNA circular abertas, e com isso sofrem deleções, se integrando ao genoma da célula hospedeira (FERRAZ, 2012).

O HPV é um vírus de DNA, dupla-fita, membro da família papovaviridae, de aproximadamente 8000 pares de bases e atualmente, existem mais de 100

genótipos de HPV identificados (RIVOIRE, 2006). Esse vírus pertence à família *Papillomaviridae* e ao gênero *Papilomavírus*. Ele possui algumas características peculiares, como não ter seu vírus envelopado, com 55 nm de diâmetro, seu capsídeo ser composto por 72 capsômeros, DNA fita dupla circular e possuir aproximadamente 8000 pares de bases (VIDAL et al., 2012).

O vírus do HPV é pequeno e possui seu genoma dividido em 3 regiões, uma região distal (L), outra região proximal (E) e uma longa região de controle (LCR), como mostrado na figura 01. A região L, codifica as cápsulas das proteínas virais, e contém dois genes, o L1 e o L2. A região E, codifica proteínas ligadas a replicação viral e controle de transcrição. A região LCR, encontra-se entre as regiões E e L, e está vinculada aos diversos locais que contém os fatores de transcrição nuclear e viral, e divulgadores de sequências (NAKAGAWA et al., 2010).

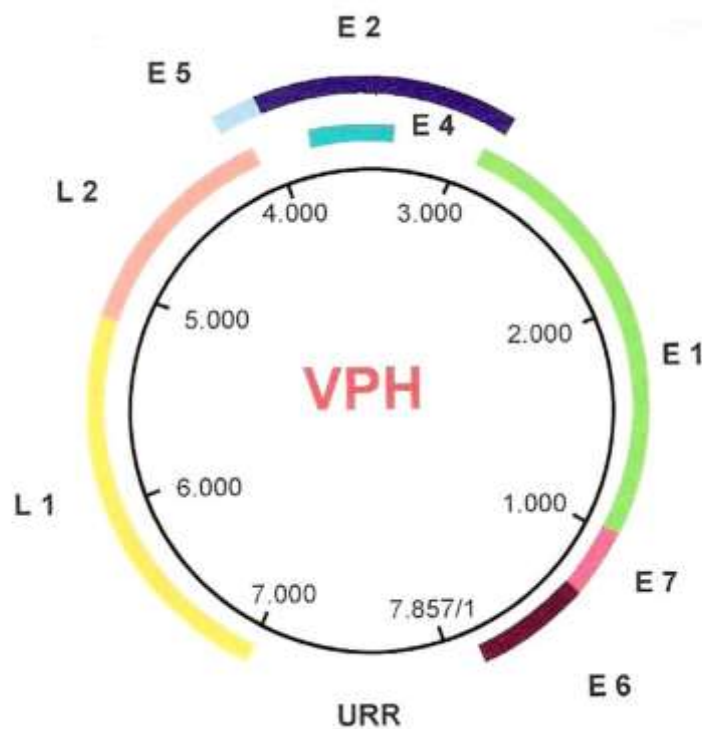
Na região proximal (E), também conhecida como genes precoces ou early, existem subdivisões dos genes pertencentes a esse grupo, sendo eles E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Esses genes são expressos logo após a infecção, e tem em seus produtos a função de regular a replicação e expressão do DNA viral, além de alguns desses estarem envolvidos na transformação celular (MAGALHÃES et al., 2017).

Cada um dos seis genes da região E, possui uma função, sendo elas: E1 tem por função a atividade da DNA helicase e atividade de ATPase; E2 regula a replicação e transcrição viral e controle da região E; E4 é expresso inicialmente nos epitélios que estão em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina de células epiteliais em cultura e na liberação do vírus; E5 tem por atividade a transformação do HPV-16 in vitro; E6 possui papel no processo de transformação, induz a síntese de DNA em células de repouso e possui propriedades de inativar p53 induzindo a degradação celular; e por fim E7 que se liga na proteína retinoblastoma (pRb), resultando na inativação funcional e com isso a progressão para a fase S do ciclo celular (SANLEMENTE; GILL, 2002).

A região distal (L), também conhecida como genes tardios, são subdivididos em L1 e L2, sendo a primeira a principal proteína do capsídeo, e a segunda a menor proteína do capsídeo. Essa região tem como função codificar as duas proteínas do capsídeo viral, que são responsáveis pela produção viral e

o empacotamento do DNA (KANODIA et al, 2007).

Figura 01: Representação esquemática do genoma do HPV, demonstrando as regiões precoces (E) e tardias (L).



Fonte: MUNOZ et al, 2006

Uma cadeia de eventos ocorrerá, por mitoses, para que a proliferação celular aconteça, e o vírus tenha sucesso. Nos seres eucariontes, a divisão celular é dividida em quatro fases, G1, S, G2 e M, sendo que a fase G1 é aquela em que a célula inicia a ativação de uma série de genes (incluindo aqueles necessários à síntese de ribossomos e tradução de proteínas); fase S é aquela do período de duplicação do DNA; G2 seria a fase de intervalo entre o final da síntese e o início da mitose; e por fim, na fase M ocorre a divisão do núcleo seguida por citocinese (FERRAZ et al., 2012).

A partir da fase G1, o ciclo celular será regulado por proteínas conhecidas como ciclinas, as quais formam um complexo juntamente com as proteínas quinases ciclinas-dependentes, as CDKs. Esses complexos ciclina-CDKs, são

aqueles que regulam a fosforilação das proteínas que estão envolvidas na continuação do ciclo (FERRAZ et al., 2012).

A proteína RB, fruto do gene RB (primeiro gene supressor de tumor a ser descoberto), possui um efeito antiproliferativo, uma vez que controla a transição da fase G1 para a fase subsequente, S. Quando na forma ativa, a proteína está ligada ao fator de transcrição E2F, o qual estimula os genes envolvidos na fase S, porém a ação de E2F permanece bloqueada. Os complexos ciclina-CDKs fosforilam a proteína RB, tornando-a inativa e se desligando do fator E2F, permitindo a continuidade ao ciclo (FERRAZ et al., 2012).

O gene p53, é outro gene supressor de tumor, e é uma das principais vias de controle para o ciclo celular, reparo de DNA e indução de morte celular por apoptose. Esse gene tem como função impedir as células irregulares de completarem seu ciclo. O gene possui três mecanismos para impedir a transformação neoplásica, através da interrupção do ciclo em células com DNA alterado, reparando o DNA e pela apoptose nas células que não foram possíveis o reparo (FERRAZ et al., 2012).

Para que a infecção por HPV tenha início, partículas virais precisam atingir às células da camada proliferativa basal e parabasal. Segundo estudos, acredita-se que o vírus permaneça na sua forma episomal, com baixo número de cópias, na região da camada basal. Nesse momento, a expressão dos genes E6, E7, E1 e E2 são bem baixos, apenas para manutenção genômica do vírus. A expressão dos genes virais é regulada e depende da diferenciação de células infectadas pelo vírus (DOORBAR, 2005).

A infecção pelo HPV propriamente dita, passa por cinco etapas, sendo elas: infecção, manutenção do genoma, fase proliferativa, amplificação e síntese e liberação das novas partículas virais (FERRAZ et al., 2012).

Ao invadir uma célula, o genoma dos vírus de alto risco se integram no DNA da célula hospedeira, após quebra do seu DNA nas regiões E1 e E2. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral, e são expressas onde ocorre maior expressão do gene E4. O gene E4 é muito importante, pois está relacionado com alteração da matriz intracelular, maturação e replicação do vírus. A formação e liberação das partículas virais, ocorre na superfície do epitélio, sem que ocorra a lise da célula hospedeira, completando e caracterizando o ciclo de infecção pelo HPV (FERRAZ et al., 2012).

Os diferentes potenciais oncogênicos do Papilomavírus humano, estão relacionados aos produtos dos genes E6 e E7, uma vez que interagem com variedade de proteínas reguladoras do ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor. A proteína E7 inibe atividade da proteína RB, e com isso aumenta a proliferação celular no epitélio infectado. Além disso, o HPV interfere no controle do ciclo e na apoptose, através dos genes E6 e E7, que se ligam a p53, levando a sua degradação. Com a degradação da p53, a integridade do DNA replicado é comprometida, levando a instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação irregular das células modificadas, potencializando o tumor (FERRAZ et al., 2012).

A prevenção é a melhor escolha no controle da disseminação da infecção por HPV, uma vez que o uso do preservativo diminui a viabilidade da transmissão durante a relação sexual, entretanto não elimina completamente o contágio, que pode ocorrer através do contato com a pele e a mucosa contaminadas. Outras possibilidades somadas ao preservativo, são os exames clínicos periódicos e a vacinação, que garantem a diminuição de contágio e proliferação da infecção (Guia do HPV, 2017).

As vacinas no combate do HPV podem ser de dois tipos, profiláticas ou terapêuticas, sendo que o último tipo citado ainda não possui grande eficácia. A vacina terapêutica é produzida através de outras proteínas, com proposta de antígenos vacinais, especialmente E6 e E7, que estão envolvidas no descontrole da proliferação e transformação celular, e sensibilizariam as células imunocompetentes no combate a infecção viral. As profiláticas, estimulam a resposta humoral, através do contato com partículas morfológicamente semelhantes ao vírus, sem que contenham o DNA viral. Os anticorpos induzidos pela vacina são liberados na mucosa genital, o que leva ao impedimento infeccioso prematuro (ZARDO et al., 2013).

As vacinas profiláticas contra o HPV disponíveis no mercado são de dois modelos, bivalentes e quadrivalentes, e tem por objetivo a diminuição da incidência do Papiloma vírus humano e suas lesões clínicas e subclínicas. As duas vacinas utilizam partículas similares as virais, gerando anticorpos neutralizantes contra a L1, que é a maior proteína do capsídeo viral. A vacina bivalente, estabelece imunidade contra os tipos de HPV 16 e 18, que são os relacionados ao carcinoma ano genital e orofaríngeo. A vacina quadrivalente,

imuniza contra o HPV 6 e 11, que levam as verrugas ano genitais (NADAL et al., 2009).

Os métodos usados na detecção do DNA do HPV nas lesões variam amplamente na sua sensibilidade e especificidade. Estes são divididos em três categorias: os de baixa sensibilidade, que são imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, por só detectarem o vírus quando presente em mais de 10 cópias do DNA viral por célula; os de moderada sensibilidade, que compreendem hibridização Southern blot e dot blot, por só detectarem o vírus quando de 1 a 10 cópias do DNA viral por célula; e o de alta sensibilidade que é a reação da polimerização em cadeia (PCR), por detectar o vírus em menos de 1 cópia do DNA viral por célula (CASTRO; FILHO, 2006).

O teste de melhor sensibilidade é a Reação em Cadeia de Polimerase, o PCR. Esta técnica foi desenvolvida no final da década de 80 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994 (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Consiste na multiplicação de um trecho específico do DNA utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até que sua concentração seja detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias (VIEIRA, 2017).

É um processo térmico cíclico que inclui três etapas: desnaturação, onde a dupla fita de DNA é separada em fitas simples; anelamento, onde os iniciadores anelam especificamente com as suas sequências complementares de DNA alvo fita simples, e finalmente, a extensão do iniciador, onde um DNA polimerase termoestável gera fitas “filhas” de DNA que atravessam a região entre dois iniciadores. A partir de então, as duplas fitas recém-geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente (CASTRO; FILHO, 2007). A concentração final do DNA molde na solução é muito maior (da ordem de 235) do que a inicial, possibilitando a sua identificação (VIEIRA, 2015).

Para a PCR, são necessários sistemas iniciadores (primers) que consistem em sequências de pares de bases de DNA, que vão se acoplar em regiões específicas do DNA alvo, seja na região L ou E do HPV. Existem iniciadores específicos de cada tipo de HPV assim como iniciadores consensus ou gerais, que podem detectar uma gama de diferentes tipos de HPV. Os iniciadores gerais que se acoplam na região L1 do HPV são os que têm maior sensibilidade e especificidade (XAVIER, 2007).

A PCR multiplex é uma variante de PCR convencional na qual dois ou mais

loci são simultaneamente amplificados na mesma reação, ao incluir mais do que um par de iniciadores em cada reação. Ao amplificar simultaneamente mais do que um locus na mesma reação, a PCR multiplex está se tornando uma metodologia rápida e conveniente de tipagem (HENEGARIU et al., 1997).

Recentemente, novas variações do PCR Multiplex estão sendo estudadas para a detecção do DNA do HPV. Ressaltando-se a *Nested Multiplex PCR* (NMPCR), que primeiramente amplifica regiões consenso do HPV, aumentando o número de cópias do vírus, para posterior genotipagem com primers específicos, utilizando-se a metodologia Multiplex (KIANI et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Detectar e genotipar o Papilomavírus Humano (HPV) de alto e baixo risco oncológico, em amostras da cérvix uterina de pacientes com diagnóstico citológico de células glandulares atípicas, por meio da utilização da técnica NMPCR.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a frequência de detecção de HPV-DNA nas amostras biológicas coletadas.

Desenvolver e padronizar a técnica de Nested Multiplex PCR no laboratório de biologia molecular do curso de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do curso de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie (MACKENZIE), localizado na cidade de São Paulo, em parceria com o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), onde as amostras biológicas foram coletadas.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Presbiteriana Mackenzie (MACKENZIE), e ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), aprovado (código1.526.973).

3.3. COLETA DO MATERIAL

Todas as participantes descritas neste estudo concordaram com o desenvolvimento do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram adotados como critérios de inclusão do estudo:

- Mulheres, de qualquer idade, provenientes do sistema único de saúde (SUS) de abrangência da região convênio Butantã, com resultado colpocitológico com alteração sugestiva de AGC/AGC-favorecendo neoplasia, encaminhadas para o ambulatório de Colposcopia e PTGI do Hospital Universitário da USP.
- Mulheres, de qualquer idade, provenientes da comunidade USP ou dependentes de funcionários da USP, com resultado colpocitológico com alteração sugestiva de AGC/AGC-favorecendo neoplasia, encaminhadas para o ambulatório de Colposcopia e PTGI do Hospital Universitário da USP.

Após realização do exame ginecológico especular, por parte da equipe médica, prosseguiu-se a coleta de material cervical uterino, e a critério do profissional realizador, seguiu-se exame colposcópico convencional com realização de biópsia, em pacientes com achados colposcópicos anormais.

O procedimento de coleta consistiu em introduzir a escova de coleta (kit *digene HC2 DNA Collection Device*) no orifício endocervical, com giro de 360° e posterior retirada da escova, acondicionando em um tubo apropriado contendo meio de transporte de amostra.

Este material foi acondicionado a 4°C, transportado em gelo e encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular do curso de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, onde seguiu-se a extração de DNA das amostras.

O material biopsiado foi encaminhado para estudo histopatológico, realizado pelo serviço de anatomia patológica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, porém, estes resultados não foram utilizados neste trabalho.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA do material coletado, foi realizada utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®), com algumas modificações. Após descongelamento do material, foram adicionados 400 ul de PBS (pH 7,5), e centrifugação por 5 minutos à 13.200 rpm. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 350 ul de PBS, 20 ul de proteinase K e 400 ul de Cell Lysis Buffer (CLD), e posteriormente vortexou-se o tubo por aproximadamente 30 segundos. O tubo foi então incubado à 56°C por 30 minutos. Posteriormente, retirou-se o calor e adicionou-se 500 ul de Binding Buffer (BBA), e vortexou o material por 10 segundos.

A coluna com o tubo coletor foi então preparada e montada, sendo uma coluna para cada amostra. O líquido contido no tubo, é então transferido para a coluna, e centrifugou-se por 2 minutos à 13.200 rpm. O coletor foi trocado por um novo. Adicionando-se 500 ul de Column Wash Solution (CWD) na coluna, e centrifugando por 2 minutos à 13.200 rpm. Esse último passo, foi repetido por mais 2 vezes, resultando em um total de 3 vezes de lavagem com CWD. Por fim, colocando a coluna com um eppendorf embaixo, adicionou-se 100 ul de Nuclease Free Water na coluna, e centrifugando por 1 minuto à 13.200 rpm, obtendo assim o DNA do material coletado.

O DNA extraído foi quantificado por fluorimetria, utilizando-se o kit *QuantiFluor(TM) dsDNA System* e leitura pelo equipamento Quantus-Fluorometer (Promega®).

3.5. PCR

As reações de *Nested Multiplex PCR* foram realizadas com uma primeira fase de amplificação por PCR, utilizando-se os *primers* da região consenso E6/E7 do HPV, Gp-E6-3F, Gp-E7-5B e Gp-E7-6B (SOTLAR et al., 2004).

O PCR foi realizado com um volume final de 50 µL, contendo 25 µL do Mix de reação (GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix – Promega), 1 µL de cada primer (10 pmol), 20 uL de DNA (aproximadamente 15 a 20 ng/ µL de DNA) e 2 µL de água ultrapura esterilizada.

Para amplificação do DNA dos genótipos específicos do HPV, foram utilizados os *primers* tipo-específicos, descritos na tabela 01.

Tabela 01: Iniciadores utilizados para detecção e classificação do HPV em amostras de DNA.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Amplificação (bp)
Iniciadores consensus		
MY09	CGTCC(AC)A(AG)AG)GGA(T)ACTGATC	
MY11	GC(AC)CAGGG(AT)CATAA(CT)AATGG	450
Iniciadores específicos		
6.1	TAGTGGGCCTATGGCTCGTC	
6.2	TCCATTAGCCTCCACGGGTG	280
11.1	GGAATACATGCGCCATGTGG	
11.2	CGAGCAGACGTCCGTCCCTCG	360
16.L1-1	TGCTAGTGCTTATGCAGCAA	
16.L1-2	ATTTACTGCAACATTGGTAC	152
16.E6/7-1	TTGCTTTTCGGGATTTATGC	
16.E6/7-2	AGATCAGTTGTCTCTGGTTGCA	390
18.1	AAGGATGCTGCACCGGCTGA	
18.2	CACGCACACGCTTGGCAGGT	216
31.1	ATGGTGATGTACACAACACC	
31.2	GTAGTTGCAGGACAACCTGAC	514
33.1	ATGATAGATGATGTAACGCC	
33.2	GCACACTCCATGCGTATCAG	455

Fonte: SHIKOVA et al, 2009.

Para a detecção dos tipos específicos de HPV, os *primers* foram divididos em dois grupos: Grupo 1, contendo os *primers*: HPV 6, 11 e 33, e o Grupo 2 contendo os *primers* HPV 16E, 16L, 18 e 31 (SOTLAR et al., 2004).

Os PCRs de ambos os grupos foram realizados com um volume final de 50 μ L, contendo 25 μ L do Mix de reação (GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix – Promega), 1 μ L de cada primer (10 pmol), 2 μ L do produto de amplificação E6/E7 e água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 50 μ L.

As condições do PCR para amplificação E6/E7 foram 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, por um total de 40 ciclos. O último ciclo foi seguido de um período de alongação a 72°C por 10 minutos (SOTLAR et al., 2004).

As condições para o *nested multiplex* PCR com os *primers* específicos foram 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, por um total de 40 ciclos. O último ciclo foi seguido de um período de alongação a 72°C por 10 minutos (SOTLAR et al., 2004).

3.6. ELETROFORESE

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese, a fim de visualização das bandas formadas. Foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% com Syber Safe (Invitrogen), juntamente com 1 μ L de corante Dye Blue em cada amostra e homogeneização. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb) (λ DNA, Invitrogen®) para cada gel. Foi realizada em cuba para eletroforese, com voltagem de 100 v por aproximadamente 120 minutos. O gel foi visualizado, através da coloração do Syber safe, em luz UV.

4. RESULTADOS

4.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

O material derivado da coleta endocervical foi extraído de acordo com a bula do kit comercial (ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep - Promega®) e as quantificações foram realizadas por fluorescência. As quantidades de DNA obtidas estão descritas na tabela 02.

Tabela 02: Quantificação do DNA de amostras obtidas em raspado endocervical de mulheres com diagnóstico de atipia glandular.

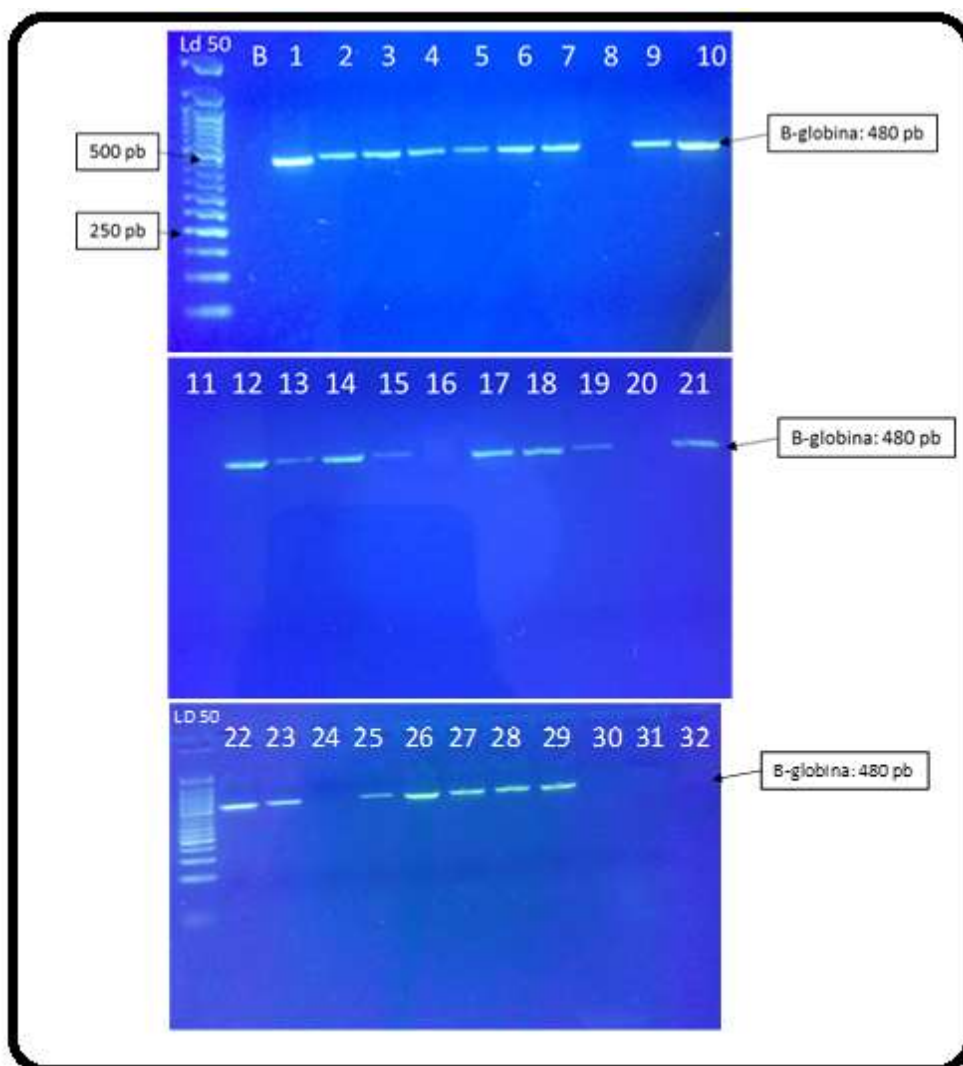
nº amostra	Idade	Quantificação DNA
1	59 anos	8,4
2	50 anos	0,11
3	32 anos	1,82
5	30 anos	8,8
6	51 anos	3,03
7	56 anos	3,69
8	53 anos	1,24
9	50 anos	4,09
10	49 anos	11
11	45 anos	0,089
12	21 anos	52
13	32 anos	4,82
14	28 anos	0,887
15	48 anos	3,94
16	40 anos	0,507
17	52 anos	1,24
18	47 anos	5,2
19	30 anos	2,95
20	54 anos	0,256
21	53 anos	5,1
22	50 anos	2,49
23	53 anos	8
24	59 anos	3,21
25	48 anos	3,61
26	61 anos	0,53
27	36 anos	15
28	44 anos	4,84
29	38 anos	7,5
30	29 anos	7,9
31	47 anos	5,2
32	30 anos	10

Devido à baixa quantidade de DNA obtida, o volume de material genético utilizado nos PCRs foi aumentado para que cada reação tivesse aproximadamente 15 ng/uL de DNA.

4.2. CONTROLE DE QUALIDADE DA REAÇÃO

Afim de verificar se as condições de reação do PCR e a qualidade do DNA obtido, foram realizados PCRs para amplificação do gene da Beta-globina, como um controle de qualidade do experimento. Os resultados das amplificações, utilizando-se os *primers* GH-20 e GH-21 estão demonstrados na figura 02.

Figura 02: Amplificação do gene da Beta-globina. Os produtos de PCR, utilizando-se *primers* GH-20 e GH-21 geraram uma banda eletroforética de 480 pb. O número das amostras está indicado no topo. pb = pares de base; LD50 = padrão de peso molecular de 50 pb.



De acordo com as eletroforeses apresentadas na figura 02, das 32 amostras testadas, 24 tiveram amplificação do gene da beta-globina, com exceção das amostras 8, 11, 16, 20, 24, 30, 31 e 32.

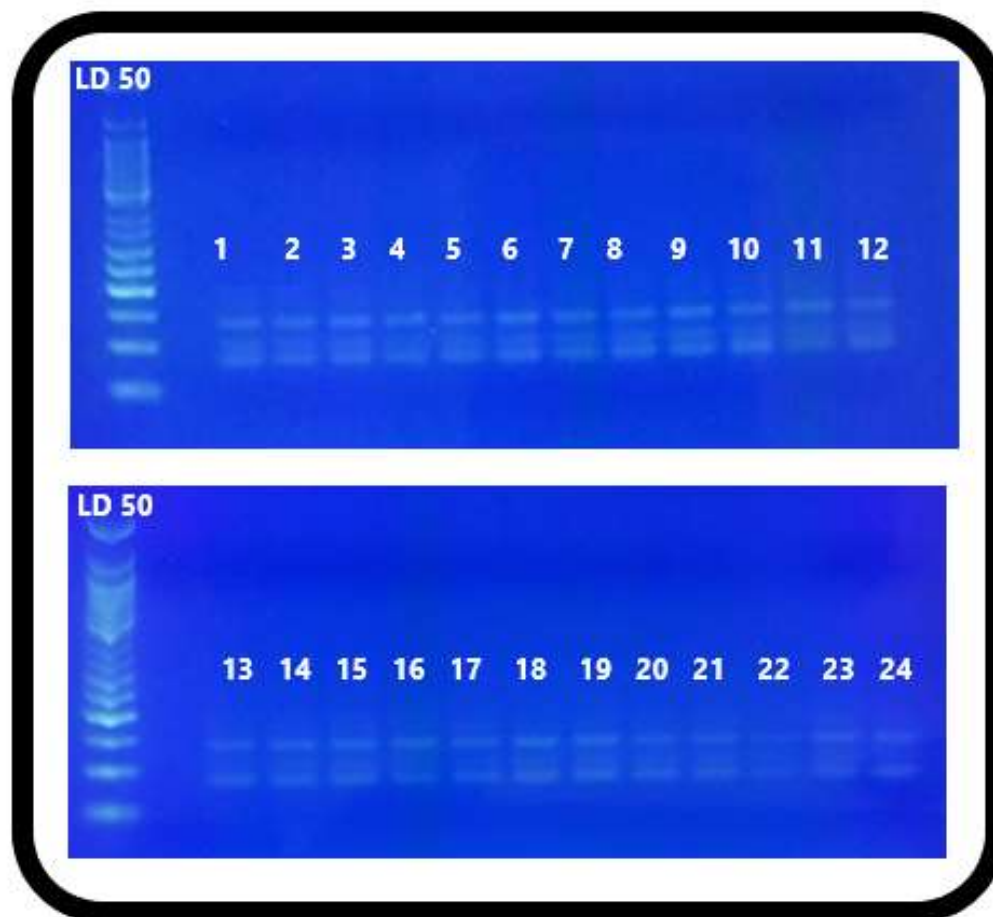
4.3. DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV

Posteriormente, as amostras que apresentaram amplificação do gene da Beta-globina foram utilizadas para realização do nested multiplex PCR (NMPCR).

O primeiro PCR foi realizado com os *primers* Gp-E6-3F, Gp-E6-5B e Gp-E6-6B e o produto desta amplificação foi utilizado para o segundo PCR, utilizando-se os primers HPV específicos, divididos em dois grupos: Grupo I contendo os primers HPV-6, HPV-11 e HPV-33 e Grupo II contendo os primers HPV-16L, HPV-16E, HPV-18 e HPV-31.

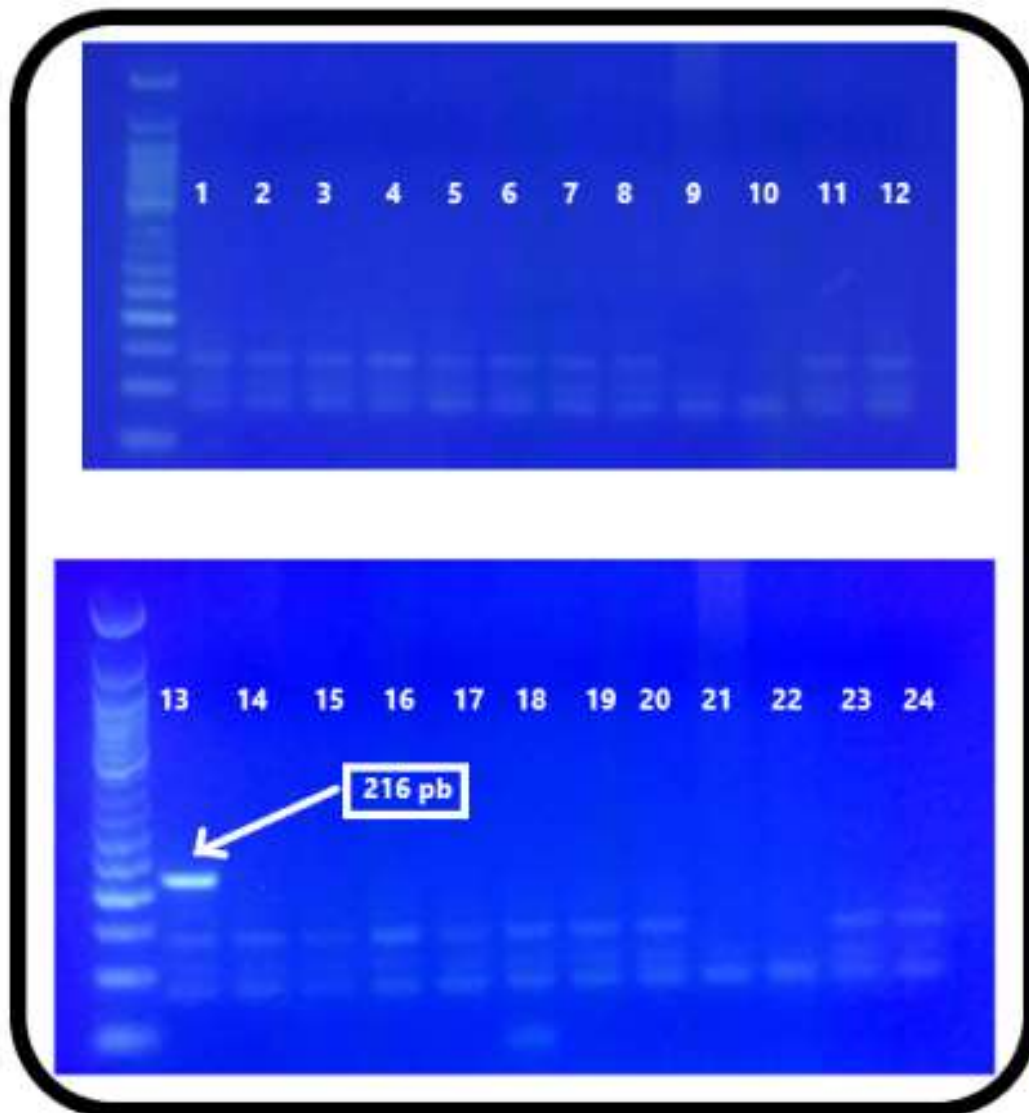
Os resultados destes PCRs estão representados nas Figuras 03 e 04.

Figura 03: Amplificação dos genótipos HPV 6, 11 e 33. Os produtos de PCR, utilizando-se *primers* HPV-6.1 e 6.2, HPV-11.1 e 11.2, HPV-33.1 e 33.2, geraram uma banda eletroforética de 280, 360 e 455 pares de base, respectivamente. O número das amostras está indicado no topo. pb = pares de base; LD50 = padrão de peso molecular de 50 pb.



O HPV-6, HPV-11 e HPV-33 não foi detectado em nenhuma amostra.

Figura 04: Amplificação dos genótipos HPV-16E, 16L, 18 e 31. Os produtos de PCR, utilizando-se *primers* HPV-16.L1 e 16.L2, HPV-16.E1 e 16.E2, HPV-18.1 e 18.2, HPV-31.1 e 31.2, geraram uma banda eletroforética de 152, 390, 216 e 514 pares de base, respectivamente. O número das amostras está indicado no topo. pb = pares de base; LD50 = padrão de peso molecular de 50 pb.



Analisando-se as eletroforeses em gel de agarose da figura acima, verifica-se a presença do HPV tipo 16L, 16E e 31 não foi encontrado em nenhuma amostra. O HPV tipo 18 foi encontrado na amostra 13.

5. DISCUSSÃO

O material cérvico-vaginal coletado no hospital foi submetido a testes em um projeto piloto inicial. Posteriormente foi realizada nova extração do material, utilizada para este projeto. Este procedimento resultou em uma baixa quantidade de DNA, como demonstrada na tabela 02. Porém, a quantidade de DNA obtida foi o suficiente para realizar as determinações, uma vez que podem ser utilizadas quantidades mínimas de 5 ng de DNA para uma boa técnica de PCR (ERLICH, et al., 1991).

A amplificação do gene da Beta-globina é largamente utilizada para avaliar a integridade e triagem para verificar a presença de inibidores da PCR, podendo ser considerado como um “gene controle” da reação (DEMATHE et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que das 32 amostras coletadas, 24 apresentaram amplificação do gene da beta-globina e, portanto, poderiam ser utilizadas para as análises posteriores. As oito amostras que não tiveram amplificação do gene da Beta-globina não foram utilizadas para a determinação do DNA-HPV.

As eletroforeses resultantes do NMPCR demonstraram que a técnica utilizada amplificou as bandas específicas em ambos os grupos (Grupo 01 e Grupo 02). Interpretando-se os resultados eletroforéticos em conjunto, observou-se presença de HPV de alto risco (HPV 18) em uma das amostras.

Estes resultados estão de acordo com a literatura. Um estudo populacional, realizado por Teixeira et al (2016), avaliou a prevalência e os genótipos do HPV em 200 mulheres atendidas em um Hospital Universitário no sul do país. Do total, 55 mulheres foram detectadas com HPV, dessas mais de 90% eram de alto risco oncogênico, com predominância do tipo viral 18.

Meshner et al. (2015) encontrou 95,8% de positividade para pelo menos um tipo de HPV de alto risco em mulheres com câncer cervical invasivo.

Segundo INCA (2018), cerca de 291 milhões das mulheres no mundo são portadoras do HPV, dessas 32% são infectadas pelo tipo viral 16 e 18, corroborando com o resultado encontrado nesse estudo, mesmo que o presente estudo possua um número reduzido de pacientes.

Nossos resultados demonstraram que a maior prevalência encontrada foi

para o HPV 18, assim como encontrado em outros estudos (ANDERSON, et al., 2016; BRUNI, et al., 2010).

A infecção por múltiplos vírus não foi encontrada em nas amostras analisadas neste trabalho. Aproximadamente 72,7% de universitárias do norte do Brasil apresentaram múltiplas infecções (VIEIRA, et al., 2017). Já Balanda et al. (2016), encontrou que apenas 34,7% das mulheres estudadas apresentavam múltiplas infecções e um número ainda menor (7,15%) foi observado por Anderson et al. (2016) e apenas 26% de mulheres moradoras dos Países Baixos apresentaram múltipla infecção por HPV (MOLLERS, et al., 2014). Estes trabalhos foram avaliados em populações com diagnósticos diversificados de lesão cervical, o que dificulta a comparação com nossos resultados, além do fato de que o número de pessoas inseridas em nosso estudo é baixo.

6. CONCLUSÃO

Observou-se a existência de HPV de alto risco em uma das amostras de cérvix uterina de pacientes com diagnóstico citológico de células glandulares atípicas. O tipo de HPV encontrado foi o 18.

A múltipla infecção por HPV não foi detectada nas amostras analisadas, fato este que deve ser melhor explorado em trabalhos futuros, assim como o não aparecimento em nenhuma amostra do tipo viral 16.

A técnica de NMPCR foi implantada com sucesso no laboratório de Análises Clínicas do curso de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, porém ainda são necessários ajustes para que as bandas inespecíficas sejam minimizadas. Estudos com um número maior de amostras devem ser continuados por este grupo de trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.A., O'RORKE, M.A., WILSON, R., et al. HPV prevalence and type-distribution in cervical cancer and premalignant lesions of the cervix: A population-based study from Northern Ireland. **J Med Virol.**;88(7):1262-70, 2016.
- BALANDA, M., QUIERO, A., VERGARA, N., et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in Chile, 2014-2015. **Med Microbiol Immunol.**;205(6):585-594, 2016.
- BRUNI, L., DIAZ, M., CASTELLSAGUÉ, X., et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **J Infect Dis** 202(12):1789–1799, 2010.
- 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. 121 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- CASTRO, Therezita M. et al. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 75, n. 2, p. 167-171, 2009.
- CASTRO, Therezita Peixoto Patury Galvão; BUSSOLOTI FILHO, Ivo. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 72, n. 2, p. 272-282, 2006.
- DEMATHE, A., BERNABE, D.G., GARCIA, J.F. et al. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. **J Bras Patol Med Lab.**; 46 (2): 85-90, 2010.
- DOORBAR, John. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, v. 32, p. 7-15, 2005.
- EHRlich, H.A., GELFAND, D., SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**. 252, 1643–51, 1991.
- FERRAZ, Laís de Campos; SANTOS, Ana Beatriz Rossetti; DISCACCIATI, Michelle Garcia. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos; Cell cycle, HPV and cervical intraepithelial neoplasia evolution: biomarkers selection. *J. Health Sci. Inst*, v. 30, n. 2, 2012.
- FOERSTER, V.; J. MURTAGH, Vaccines for prevention of human papillomavirus infection. **Issues Emerg Health Technol**, 75:1-4, 2005.
- INCA. (Org.). **HPV e câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>. Acesso em: 01 nov. 2018.

- INSTITUTO DO HPV. Guia do hpv: Entenda de vez os papilomavírus, as doenças que causam e o que já é possível fazer para evitá-los. p. 15, 2017.
- HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.
- INSINGA, R. P., DASBACH, E. J., ELBASHA, E. H. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. **BMC Infect Dis.** 29;9:119, 2009.
- KANODIA, Shreya; FAHEY, Laura M.; KAST, W. Martin. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Current cancer drug targets*, v. 7, n. 1, p. 79-89, 2007.
- KIANI, S.J.; MALEKSHASHI, S.S.; GHALEJOOGH, Z.Y.; et al. Detection and Typing of Human Papilloma Viruses by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in Cervical Cancer. **Jundishapur J Microbiol.**, 8(12): e26441, 2015.
- MESHER, D., CUSCHIERI, K., HIBBITTS, S., et al. Type-specific HPV prevalence in invasive cervical cancer in the UK prior to national HPV immunisation programme: baseline for monitoring the effects of immunisation. **J Clin Pathol.**;68(2):135-40, 2015.
- MOLLERS, M., VRIEND, H.J., VAN DER SANDE M.A., et al. Population- and type-specific clustering of multiple HPV types across diverse risk populations in the Netherlands. **Am J Epidemiol.** 15;179(10):1236-46, 2014.
- MUNOZ, Nubia et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, v. 24, p. S1S10, 2006.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. *Rev. Biotecnol. Cienc. Des.*, v. 33, 2004.
- PELUCCHI, C.; BOSETTI, C.; ROSSI, M.; et al. Selected aspects of Mediterranean diet and cancer risk. **Nutr Cancer.** v.61, p.756-66, 2009.
- PRASAD, S.R., Management strategies and cost effectiveness in the prevention of cervical cancer. **Clinicoecon Outcomes Res**, 1:17-23, 2009.
- RIVOIRE, W. A., CORLETA, H. V. E., BRUM, I. S., CAPP, E. Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, 6 (4): 447-451, 2006.
- SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 16, n. 3, p. 231-240, 2002.
- SASLOW, D., et al., American Cancer Society Guideline for human papillomavirus (HPV) vaccine use to prevent cervical cancer and its precursors. **CA Cancer J Clin**, 57(1):7-28, 2007.

SHIKOVA, E.; TODOROVA, I.; GANCHEV, G.; et al. Detection and typing of human papillomaviruses by PCR. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 877-880, 2009.

SOTLAR, K., DIEMER, D., DETHLEFFS, A., et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. **J Clin Microbiol.**;42(7):3176-84, 2004.

TEIXEIRA, Lisiane O et al. Prevalence of Human Papillomavirus types in women attending at University hospital in southern Brazil. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.116-123, 2 abr. 2016. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v49i2p116-123>. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/118395/115949>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

VIEIRA, R.C., MONTEIRO, J.S.V., MANSO, E.P., et al. Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Brazil. **Infect Agent Cancer**. 2015.

VIEIRA, BSc Daniel Perez. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Disponível em: <<http://www.imtsp.fm.usp.br/Protocolo.pdf>>, v. 30, 2011. Acesso em: 16 out. 2017.

WHO. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>. Acesso em: 16 out. 2017.

XAVIER, Sandra Doria et al. Frequência de Aparecimento de Papilomavírus Humano (HPV) na Mucosa Oral de Homens com HPV Anogenital Confirmado por Biologia Molecular. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 11, n. 1, p. 36-44, 2007.



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
ANEXO 7



DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DE CONTEÚDO

Declaro ter atualizado do conteúdo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado e que cumprimos as determinações da banca examinadora na versão final entregue do Trabalho de Conclusão de Curso. Esta cópia preenchida e assinada deverá ser entregue no prazo determinado pelo professor da disciplina de TCC anexada à cópia digitalizada da versão final do trabalho, no Moodle da disciplina.

Nome do Orientador: Eda do C Pinheiro DRT: 1134997
Assinatura: Eda do C Pinheiro Data: 14 / 12 / 2018
Nome do Aluno: MARINA ANCHIETA BITUN Matrícula: 31933030
Assinatura: Marcelinda Bitun Data: 13 / 12 / 2018
Título final do trabalho Análise em Amostras glandulares cervico-vaginais
de presença de HPV