

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



NOVAS ABORDAGENS PARA O RASTREIO DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO E PARA A PRÁTICA CLÍNICA

Importância dos marcadores moleculares da infecção por Vírus do Papiloma Humano

Marta Costa Neto

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



NOVAS ABORDAGENS PARA O RASTREIO DO CANCRO DO COLO DO ÚTERO E PARA A PRÁTICA CLÍNICA

Importância dos marcadores moleculares da infecção por Vírus do Papiloma Humano

Marta Costa Neto

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Orientadores da Dissertação de Mestrado:

Doutora Ângela Pista

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Prof. Doutor Rogério Tenreiro

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

2009

Projecto de Mestrado desenvolvido no laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis para o Vírus do Papiloma Humano, Poliomavírus e Vírus Herpes genital, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

AGRADECIMENTOS

Muitas e boas foram as pessoas que me acompanhar na realização durante este ano e durante a realização deste trabalho e aproveito a oportunidade para lhes agradecer.

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Ângela Pista, Coordenadora do Laboratório de Papilomavírus, Poliomavírus e Herpes Genital do Departamento de Doenças Infecciosas por me ter dado esta oportunidade e ter aceite ser minha orientadora. Queria agradecer-lhe os recursos, a energia e o tempo que dedicou a mim e a este projecto. Queria também agradecer-lhe o muito que me ensinou e o muito que me fez aprender. Um grande Obrigada.

Aos restantes elementos da Unidade um sentido obrigada. Ao Nuno Verdasca pela sua curiosidade, disponibilidade e pelas muitas vezes em que me auxiliou. À Dona Fátima Ribeiro pela sua enorme simpatia e por nos iluminar a todos o dia. À Ana Oliveira, pela sua paciência infinda, pelo ensino constante e pelos muitos bons momentos partilhados. Sem ti não teria sido possível, ou teria pelo menos sido tremendamente mais difícil.

À Prof^a Doutora Teresa Paixão, Assessora do Centro de Virologia, pela presença e apoio constante, pela sabedoria e por acreditar em mim.

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, na pessoa do seu Presidente Prof. Doutor Pereira Miguel, por me ter aceite para a realização deste trabalho experimental e por me ter fornecido as condições necessárias à sua realização.

Ao Prof. Doutor Rogério Tenreiro, por me ter levado a querer sempre mais, pela ajuda, e por saber sempre dizer o que eu preciso de ouvir. Obrigada.

À Andreia Barateiro por ter criado a base sob a qual pude trabalhar.

À Rita Ferreira pelo apoio, pela ajuda e pela amizade. Contigo o dia começa sempre melhor.

À Cândida Delgado pela partilha, no trabalho e fora dele. Pelos artigos e pelas ajudas e trocas de ideias e de momentos. E tudo o mais que é tanto.

À Mafalda Uva por ter tornado os dias mais fáceis, e mais alegres.

À minha irmã por me ensinar a viver. Por acreditar em mim mesmo quando eu não acredito e me obrigar a seguir em frente mesmo quando eu tenho medo e não quero olhar.

À minha avó por ser o meu mundo e por me deixar viver no seu.

Um imenso agradecimento aos meus pais, por tudo o que me permitiram e tudo o que me ensinaram, por me amarem e ainda assim terem a coragem de me ver crescer. Por tudo aquilo de que abdicaram e pelo sorriso que têm sempre guardado para mim, obrigada.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
1. VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO.....	10
2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO GENITAL POR HPV.....	11
3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV.....	13
4. MARCADORES MOLECULARES.....	14
4.1 Carga Viral.....	14
4.2 Integração do DNA.....	16
4.3 Expressão de Oncogenes Virais.....	17
4.4 Metilação do DNA.....	17
5. OBJECTIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
1. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	20
2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
3. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV.....	20
3.1 Extracção de DNA.....	20
3.2 Detecção e Tipificação do HPV.....	20
3.3 Métodos de Confirmação da Infecção por HPV.....	20
3.3.1 Purificação de produtos da PCR.....	20
3.3.2 Electroforese em gel de agarose.....	21
3.3.3 Preparação da reacção de sequenciação.....	21
3.3.4 Análise de sequências de DNA.....	21
4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HPV 16 E 18.....	21
5. ESTUDO DO ESTADO FÍSICO DO DNA DO HPV 16 E 18.....	22
6. DETECÇÃO DO RNAm DOS ONCOGENES VIRAIS E6/E7 DOS HPV 16, 18, 31, 33 E 45.....	23
6.1 Extracção de Ácidos Nucleicos.....	23
6.2 Detecção do RNAm por NASBA.....	23
7. QUANTIFICAÇÃO DO RNAm E7 DO HPV 16 E 18.....	24
8. ESTUDO DA METILAÇÃO DO GENE L1 DO HPV 16 E 18.....	25
9. TRATAMENTO DOS DADOS.....	28
10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28

RESULTADOS	29
1. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV.....	29
1.1 Descrição da População Considerada.....	30
1.2 Descrição da População Estudada.....	30
2. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HPV 16 E 18.....	30
2.1 Implementação da Quantificação da Carga Viral do HPV 16 e do HPV 18 por PCR em Tempo Real.....	30
2.2 Avaliação da Correlação entre a Carga Viral do HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão.....	32
2.2.1 Quantificação da carga viral do HPV 16.....	32
2.2.2 Quantificação da carga viral do HPV 18.....	33
3. ESTUDO DO ESTADO FÍSICO DO DNA DO HPV 16 E 18.....	33
3.1 Implementação do Metodologia para o Estudo do Estado Físico do DNA do HPV 16 e 18 por PCR em Tempo Real.....	33
3.2 Avaliação da Correlação entre o Estado Físico do DNA do HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão.....	35
4. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A DETECÇÃO DO RNAm DOS ONCOGENES VIRAIS E6/E7 DOS HPV 16, 18, 31, 33 E 45 E A PROGRESSÃO DA LESÃO.....	36
5. QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE E7 DO HPV 16 E 18.....	37
5.1 Desenvolvimento e Implementação da Quantificação dos Transcritos de E7 do HPV 16 e 18 por PCR em Tempo Real.....	37
5.2 Avaliação da Correlação entre a Expressão de E7 do HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão.....	38
5.2.1 Quantificação de RNAm E7 do HPV 16.....	38
5.2.2 Quantificação de RNAm E7 do HPV 18.....	39
6. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA O ESTUDO DA METILAÇÃO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO HPV 16 E 18 POR MSP.....	40
7. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES METODOLOGIAS APLICADAS.....	42
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos da carcinogénese induzida pelo Vírus do Papiloma Humano.....	14
Figura 2: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação da carga viral.....	31
Figura 3: Relação entre a carga viral do HPV 16 e o diagnóstico citopatológico.....	32
Figura 4: Relação entre a carga viral do HPV 18 e o diagnóstico citopatológico.....	33
Figura 5: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação dos genes E2 e E6.....	34
Figura 6: Distribuição de frequências do estado físico do DNA de HPV 16 e 18.....	35
Figura 7: Distribuição dos valores da razão entre os genes E2 e E6 nos casos de HPV 16 (A) e 18 (B) com DNA concomitante.....	36
Figura 8: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação do RNAm do gene E7.....	38
Figura 9: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 16 e o diagnóstico citopatológico.....	39
Figura 10: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 16 e o resultado do sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV.....	39
Figura 11: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 18 e o diagnóstico citopatológico.....	40
Figura 12: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 18 e o resultado do sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV.....	40
Figura 13: Representação gráfica de 3 resultados de sequenciação para a mesma região do gene L1 no local de ligação dos primers 18L1met-F e 18L1unmet-F.....	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - <i>Primers</i> e Sondas para a PCR em tempo real.....	22
Tabela II - <i>Primers</i> para a PCR em tempo real.....	23
Tabela III - <i>Primers</i> desenhados para a quantificação do RNAm de E7 do HPV 16 e 18.....	24
Tabela IV - <i>Primers</i> desenhados para a amplificação de um fragmento do gene L1 e da LCR do HPV 18.....	26
Tabela V - <i>Primers</i> para a MSP.....	27
Tabela VI - Distribuição da proporção da infecção por HPV nas mulheres consideradas para o estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.....	29
Tabela VII - Distribuição da proporção da infecção por HPV nas mulheres incluídas no estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.....	30
Tabela VIII - Distribuição da proporção do RNAm de E6/E7 obtida pelo sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV nas mulheres incluídas no estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.....	36

RESUMO

A infecção persistente por um dos 15 Vírus do Papiloma Humano (HPV) de alto risco é considerada um factor necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Nos últimos anos, tem-se assistido a uma intensa procura de novos métodos moleculares de diagnóstico que permitam diferenciar entre as mulheres cujas lesões vão progredir para carcinoma invasivo e aquelas cujas lesões regredirão espontaneamente.

No presente trabalho, foram desenvolvidas e implementadas metodologias de PCR em tempo real para a quantificação da carga viral, o estudo do estado físico do genoma viral na célula hospedeira e a quantificação dos transcritos dos oncogenes virais do HPV 16 e 18, com vista à identificação de indicadores de prognóstico para o desenvolvimento do cancro do colo do útero.

A quantificação do DNA do HPV 16 e 18 permitiu identificar uma correlação positiva entre a carga viral e a gravidade da lesão.

O estudo do estado físico do DNA do HPV 16 e 18, embora não tenha permitido estabelecer uma relação prognóstica entre o estado físico do DNA viral e o tipo de lesão, permitiu constatar que a integração do DNA do HPV 16 é um acontecimento precoce e que as formas exclusivamente integradas do HPV 18 aumentam com a gravidade da lesão.

A quantificação do RNAm do E7 do HPV 16 permitiu estabelecer uma associação positiva entre a expressão dos transcritos virais e o grau da lesão. No caso do HPV 18, o pequeno número de casos estudados não permitiu estabelecer uma correlação.

De acordo com os resultados obtidos, para além da tipificação dos HPV de alto risco, a quantificação da carga viral poderá ser um importante biomarcador para a identificação precoce dos casos com maior probabilidade de progressão e desenvolvimento de carcinoma do colo do útero e lesões precursoras.

Cancro do colo do útero; HPV de alto risco; Indicadores de prognóstico; Marcadores moleculares; PCR em tempo real;

ABSTRACT

Persistent infection with one of the 15 high-risk human papillomaviruses (HPV) is a necessary but insufficient cause of cervical cancer development.

In the last few years, there has been an intense pursuit for new molecular diagnostic methods that allow the differentiation between women whose lesions are destined to progress to invasive carcinoma and those whose lesions will spontaneously regress.

In the present study real-time PCR methodologies for viral load quantification, for the assessment of the physical status of HPV DNA in the host genome and for the quantification of viral oncogene transcripts of HPV 16 and 18, were developed and implemented, aiming at finding prognostic indicators for the development of cervical cancer.

Although the study of HPV 16 and 18 physical did not allow the establishment of a prognostic association between viral DNA physical status and lesion grade, it did allow the conclusion that HPV 16 DNA integration is an early event and that HPV 18 integrated-only forms increased with lesion severity.

HPV 16 E7 mRNA quantification allowed the determination of a positive correlation between the level of viral transcripts expression and lesion grade. In the case of HPV 18, due to small sample size, no correlation was established.

According to the results obtained, viral load, in addition to high-risk HPV testing, could become an important biomarker for the early identification of cases with increased probability of progression and development of cervical carcinoma and precursor lesions.

Cervical cancer; High-risk HPV; Prognostic markers; Molecular markers; Real time PCR;

INTRODUÇÃO

1. VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

O Vírus do Papiloma (PV) é um grupo de pequenos vírus, de DNA circular de cadeia dupla, sem invólucro e com cápside icosaédrica, altamente ubíquos, que infectam, para além do Homem, a maioria dos mamíferos e das aves (Zheng e Baker, 2006). Inicialmente classificado na família *Papovaviridae*, juntamente com os Poliomavírus, passou recentemente a constituir uma nova família, a *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004).

O genoma dos PV é constituído por três regiões: a região não codificante LCR (*Long Control Region*), a região que codifica as proteínas de expressão precoce (E1 a E8) e a região que codifica as proteínas de expressão tardia (L1 e L2) (Dueñas-González *et al.*, 2005).

O ciclo de vida dos PV difere do das outras famílias virais, uma vez que este vírus se replica exclusivamente no epitélio pavimentoso estratificado, tirando proveito da diferenciação do próprio epitélio para a regulação da sua replicação (Frazer, 2004). Durante a infecção do epitélio o PV pode causar lesões benignas ou induzir o desenvolvimento de lesões malignas (Zheng e Baker, 2006).

Dos mais de 100 tipos de Vírus do Papiloma Humano (HPV) já identificados, cerca de 40 são capazes de infectar a mucosa anogenital (Woodman *et al.*, 2007). Os tipos de HPV são classificados em HPV de baixo risco e HPV de alto risco, consoante a sua prevalência nos carcinomas do colo do útero e lesões precursoras. Os HPV de baixo risco (HPVbr), como o HPV 6 e 11, induzem lesões benignas, como verrugas e condilomas acuminados, com um risco mínimo de progressão maligna (Fehrmann, 1993).

A infecção persistente por um dos 15 HPV de alto risco (HPVAr) (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, e 82) foi identificada como factor imprescindível, mas não suficiente, para o desenvolvimento de cancro do colo do útero (CCU) (zur Hausen, 2002).

A infecção do epitélio genital ocorre quando partículas virais atingem as células basais do epitélio pavimentoso do colo do útero, através de microabrasões ou traumatismos na superfície da mucosa (Muñoz *et al.*, 2006).

Após a infecção, os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e ocorre replicação do DNA viral sob a forma episomal. Nas camadas superiores do epitélio, ocorre expressão dos genes tardios com encapsidação do genoma viral pelas proteínas L1 e L2, e posterior formação de partículas virais no núcleo das células. Os vírus, libertados no interior das células do epitélio, têm a capacidade de provocar uma nova infecção ou de serem libertados para o exterior. A progressão de lesões não tratadas, para cancro do colo do útero, está associada à integração do genoma do vírus no cromossoma da célula hospedeira, com a consequente perda ou disrupção do gene E2, e subsequente sobreexpressão dos oncogenes E6 e E7. As proteínas E6 e E7, em excesso, vão interagir com diversos alvos celulares. A proteína E6 liga-se à p53, degradando-a, o que induz a

inibição da apoptose através da degradação da p53, enquanto que a proteína E7 vai impedir a diferenciação celular através da inibição da pRB.

Como consequência da infecção viral persistente, a actividade constante das proteínas virais E6 e E7 pode levar a um aumento da instabilidade genómica, à desregulação do ciclo celular, com perda de controlo sobre eventos cruciais como a replicação e reparação do DNA à apoptose celular, à acumulação de mutações e alterações epigenéticas em oncogenes e, em último caso, ao desenvolvimento de cancro.

2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO GENITAL POR HPV

O cancro do colo do útero é a terceira patologia ginecológica e o segundo cancro mais frequente nas mulheres entre os 15 e os 44 anos, sendo responsável por cerca 400 000 novos casos e 250 000 mortes por ano (Arias-Pulido *et al.*, 2006). A prevenção e detecção precoce do cancro do colo do útero assenta em programas de rastreio citológico. Nos países em que estes programas se encontram implementados a incidência do cancro do colo do útero teve uma redução marcada. No entanto, mais de 80% dos casos de cancro do colo do útero ocorrem em países em vias de desenvolvimento, onde nem o rastreio da população nem o tratamento são óptimos ou mesmo existentes (Frazer, 2004). Citologias isoladas sofrem de sensibilidade sub-ótima e reprodutibilidade limitada, pelo que para compensar estas deficiências são necessários programas de rastreio com repetição periódica dos testes e seguimento dos casos positivos (Molden *et al.*, 2005), o que implica um investimento contínuo de grandes dimensões.

O cancro do colo do útero desenvolve-se, normalmente, num anel de mucosa a que se dá o nome de zona de transformação, entre dois tipos diferentes de epitélio. A posição da zona de transformação do colo do útero é dinâmica, mudando gradualmente ao longo da vida da mulher, com substituição do epitélio glandular, produtor de muco, por epitélio escamoso estratificado. A prevenção do CCU, após detecção de alterações celulares pré-malignas, passa pela destruição ou excisão de regiões do epitélio da zona de transformação (Schiffman *et al.*, 2007).

A maioria dos CCU são carcinomas das células escamosas, que se desenvolvem num processo gradual a partir de lesões precursoras (Pett e Coleman, 2007), e que podem ser diagnosticados pelo rastreio citológico de células exfoliadas e confirmado por examinação histológica de uma biopsia.

A observação citológica classifica as lesões, segundo o sistema de Bethesda, em lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) (zur Hausen, 2000; Pett e Coleman, 2007). Segundo os critérios histológicos de Richart as lesões do colo do útero são classificadas em displasia ligeira (CIN1), displasia moderada (CIN2) e displasia severa ou carcinoma *in situ* (CIN3) (Steenbergen *et al.*, 2005). As LSIL são equivalentes às CIN1, enquanto que as HSIL incluem as CIN2 e as CIN3. Alterações das células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) e alterações das células escamosas de significado indeterminado que não excluem lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H), são categorias aplicadas aos casos em que a

citologia apresenta alterações celulares, mas não reúne todas as características necessárias para a classificação como LSIL ou como HSIL, respectivamente.

As LSIL geralmente representam infecções produtivas, com um risco de progressão para invasão relativamente baixo, enquanto que HSIL podem ser encaradas como infecções nas quais acontecimentos tardios do ciclo de replicação do vírus não são expressos (Middleton *et al.*, 2003).

A transmissão sexual do HPV é frequente, e a maioria das mulheres é infectada 3-4 anos após o início da actividade sexual. Apesar de cerca de ~80% das mulheres serem infectadas com HPV em alguma fase da sua vida, a maioria resolve a infecção de forma espontânea. Apenas as que mantêm infecção persistente activa, durante anos ou décadas após a exposição inicial, progredirão para doença invasiva (Fernandez *et al.*, 2009). Apesar da infecção persistente por um HPV de alto risco ser considerada um pré-requisito para o desenvolvimento do CCU (Bosch *et al.*, 2008) não existe actualmente consenso na definição de persistência da infecção por HPV (Muñoz *et al.*, 2009).

A maioria das infecções por HPV resolve espontaneamente (processo a que se dá o nome de *clearance* viral) no espaço de 1 a 2 anos após o seu aparecimento, devido à eficaz acção da resposta imunitária mediada por células (Stanley, 2006). O tempo médio para a *clearance* das infecções por HPV é de 6 a 18 meses. Em regra, quanto mais longa a persistência viral de um determinado HPV menor a probabilidade de regressão e maior o risco de desenvolvimento de lesões precursoras do cancro do colo do útero (Plummer *et al.*, 2007; Schiffman *et al.*, 2007).

Embora os factores de risco para o estabelecimento de persistência e desenvolvimento de lesão não se encontram completamente esclarecidos, o genótipo e a variante responsável pela infecção são factores determinantes assumidos. Outros possíveis co-factores, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, são a idade do primeiro contacto sexual, o número de parceiros sexuais, o uso de contracepção hormonal por longos períodos de tempo, a infecção por outros microrganismos sexualmente transmissível, a paridade, o tabagismo, a dieta e factores nutricionais (Castellsagué *et al.*, 2002), bem como factores genéticos do hospedeiro. Adicionalmente, o estado imunitário do hospedeiro influencia largamente a taxa de regressão ou progressão da infecção por HPV, pelo que indivíduos Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) positivos estão sujeitos a uma maior prevalência e persistência da infecção e, conseqüentemente a um maior risco de desenvolvimento de lesões malignas (Strickler *et al.*, 2005).

Actualmente, o diagnóstico citológico e histológico não permite distinguir entre as raras lesões intraepiteliais (SIL) com possibilidade de persistir ou progredir, e a larga maioria que irá regredir espontaneamente (Woodman *et al.*, 2007). Uma abordagem mais objectiva, permitiria racionalizar o seguimento e/ou tratamento das mulheres com lesões sem potencial de progressão. No entanto, para tal, será necessário um melhor conhecimento acerca das alterações virais e celulares responsáveis pela indução da progressão de SIL, bem como, das suas associações temporais (Pett e Coleman, 2007). O período de tempo que medeia a infecção primária e o aparecimento de cancro do colo do útero varia, regra geral, entre 10 a 15 anos.

A nível mundial, a infecção por HPV 16 e 18 é responsável por cerca de 70-75% dos casos de carcinoma invasivo do colo do útero. Enquanto que o HPV 18 é o tipo mais frequentemente associado aos adenocarcinomas do colo do útero, o HPV 16, seguido do HPV 18, é o tipo mais frequentemente detectado nos carcinomas das células escamosas (Woodman *et al.*, 2007). Variações geográficas entre os génotipos mais predominantes têm que ser tidas em consideração no estudo do HPV.

Dada a via comum de transmissão, HPV de diferentes tipos têm tendência a ser transmitidos em conjunto, o que resulta numa elevada proporção (20-30%) de infecções mistas (Schiffman *et al.*, 2007).

Actualmente, uma das formas de diminuir a incidência dos casos de CCU é a administração de uma vacina profiláctica contra a infecção por alguns tipos de HPV, entre os quais o HPV 16 e o HPV 18 (Bosch and Harper, 2006).

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

Os exames citológicos e histológicos, embora extremamente importantes na prevenção do cancro do colo do útero, são métodos de diagnóstico indirectos e não conseguem diferenciar as mulheres que vão progredir para carcinoma invasivo da grande maioria, cujas lesões regredirão espontaneamente.

Para colmatar as falhas exibidas pelo rastreio citológico, nomeadamente em termos de sensibilidade, têm sido desenvolvidos testes moleculares, que têm como objectivo a detecção do HPV como agente etiológico da doença. O diagnóstico da infecção por HPV passa pela detecção de material genético viral em amostras de células do colo do útero (Dehn *et al.*, 2007). A maioria dos testes comerciais para a detecção e tipificação dos HPV envolvem o reconhecimento de uma região do gene L1 (Keegan *et al.*, 2009). Estes testes de detecção do DNA viral apresentam maior sensibilidade e são mais reprodutíveis do que a citologia, na identificação de lesões pré-malignas e carcinomas do colo do útero (Molden *et al.*, 2007; Castle, 2008). Por outro lado, a elevada prevalência da infecção por HPV, faz com que estes testes apresentem um baixo valor preditivo positivo (Ho *et al.*, 1998; Molden *et al.*, 2005; Molden *et al.*, 2007) não conseguindo distinguir entre infecções transitórias e infecções persistentes (Cattani *et al.*, 2009). Dado que a sobreexpressão consistente dos oncogenes virais E6 e E7 é causa necessária para a transformação e imortalização celular, testes direccionados para estes oncogenes dos HPV poderão apresentar um valor de prognóstico superior ao dos testes de detecção do DNA e vir a desempenhar um papel preponderante nos programas de rastreio futuros.

Dada a importância do HPV como o agente etiológico do cancro do colo do útero, vários grupos têm desenvolvido diferentes metodologias de detecção do vírus (Quint *et al.*, 2006; Cattani *et al.*, 2009). Actualmente, existe uma necessidade contínua de testes mais específicos para o prognóstico das lesões pré-malignas, o que justifica a importância da identificação de marcadores de progressão moleculares de progressão e do desenvolvimento das respectivas metodologias.

4. MARCADORES MOLECULARES

Podem ser identificadas três etapas no desenvolvimento do cancro do colo do útero e das lesões precursoras: a infecção do epitélio por HPV de alto risco, a emergência de células com a expressão desregulada de oncogenes virais na camada basal e suprabasal do epitélio, e a progressão das lesões pré-neoplásicas para carcinoma invasivo (Knebel-Doeberitz e Syrjänen, 2006).

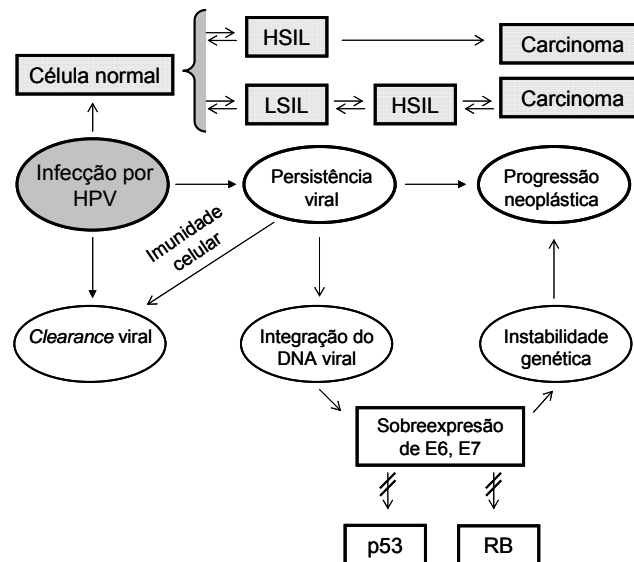


Figura 1: Mecanismos da carcinogénese induzida pelo Vírus do Papiloma Humano
HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; RB, Gene do retinoblastoma humano. Adaptado de Bosch *et al.*, 2002.

Testes baseados em marcadores moleculares, podem ser desenhados e utilizados para caracterizar estes estadios, com potencial para complementar e/ou substituir os sistemas actuais. Várias linhas de investigação têm sido desenvolvidas com vista à identificação dos biomarcadores mais informativos, do ponto de vista clínico (Knebel-Doeberitz e Syrjänen, 2006).

O tipo de HPV, a carga viral, o estado físico do DNA viral, a sobreexpressão dos oncogenes virais, a metilação do DNA viral e celular, os marcadores de proliferação celular, entre outros, apresentam-se como parâmetros em estudo, que isoladamente ou em conjunto, poderão ser importantes indicadores de prognóstico e conseqüentemente, melhorar as formas de rastreio, tratamento e seguimento pós-tratamento actualmente disponíveis.

4.1 Carga Viral

A determinação da carga viral do HPV tem sido sugerida como um importante biomarcador para o diagnóstico precoce do CCU, assim como para determinar a probabilidade de regressão ou resolução da infecção em citologias anómalas.

A discrepância nos resultados dos diversos estudos já realizados pode resultar da metodologia utilizada para a quantificação, do gene amplificado, da heterogeneidade entre as células recolhidas

na amostra, da variabilidade intratípica dos HPV nas amostras estudadas e do método utilizado para a normalização da carga viral (Broccolo *et al.*, 2009).

Apesar disso, vários estudos demonstraram que existe uma correlação positiva entre a carga viral dos HPV e o tipo de lesão, conferindo à carga viral um poder preditivo, relativamente à probabilidade de regressão ou progressão das lesões (Josefsson *et al.*, 2000; Ylitalo *et al.*, 2000; Peitsaro *et al.*, 2002; Moberg *et al.*, 2005; Carcopino *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2006; Briolat *et al.*, 2007; Gravitt *et al.*, 2007; Saunier *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009, Keegan *et al.*, 2009).

Esta correlação pode ser justificada pelo facto de: i) uma maior carga viral aumenta a probabilidade de infecção de novas células; ii) mulheres com carga viral mais elevada têm menor probabilidade de vir a eliminar o vírus, levando a uma maior persistência da infecção e, conseqüentemente, a um maior risco de desenvolver lesões; iii) uma carga viral elevada pode aumentar o número de genes carcinogénicos, o que favorece o desenvolvimento do cancro do colo do útero (Huang *et al.*, 2009).

No entanto, outros estudos têm mostrado que nos casos de carcinoma do colo do útero, as mulheres com uma carga viral mais elevada apresentam um prognóstico mais favorável (Biedermann *et al.*, 2004).

Snijders e colaboradores (2006) realizaram um estudo de quantificação da carga viral do HPV 16, 18, 31 e 33 por PCR em tempo real em que, através do estudo comparativo de mulheres com citologia normal e mulheres com CIN3, definiram um valor de *cut-off* da carga viral segundo o qual todas as mulheres com CIN3 teriam valores de carga viral superiores aos valores de cerca de um terço das mulheres com citologia normal. Desta forma, um terço das mulheres com citologia normal e um resultado de HPV positivo poderiam ser excluídas de seguimento intensivo e tratamentos desnecessários e mulheres com valores de carga viral superiores ao definido pelo estudo seriam encaminhadas para um seguimento e tratamento mais agressivo (Snijders *et al.*, 2006; Cuzick *et al.*, 2006). Neste contexto, parece mais provável que a carga viral permita discriminar infecções com HPV e com menor risco clínico com base na baixa carga viral do que identificar casos de lesão precursora com elevado risco de progressão com base em valores elevados de carga viral.

Do conjunto dos estudos publicados pode concluir-se que a quantidade de DNA de um HPV de alto risco (carga viral) num produto biológico do colo do útero infectado pode ser um importante parâmetro na identificação de infecções com relevância clínica (Cuzick *et al.*, 2006), com potencial aplicação tanto para a discriminação de mulheres com reduzida ou elevada probabilidade de progressão como para o seguimento de casos pós-tratamento.

Neste contexto, um dos objectivos do presente trabalho foi a implementação de uma metodologia para a quantificação do número de cópias do HPV 16 e do HPV 18 e o estudo de casos de citologia normal, ASCUS, LSIL, HSIL e carcinoma, para o estudo da correlação entre a carga viral e o diagnóstico citopatológico.

4.2 Integração do DNA

O estudo da integração dos HPV no genoma da célula hospedeira é uma área de investigação intensa. No entanto, os mecanismos que determinam a integração dos HPV não se encontram completamente esclarecidos (Pett e Coleman, 2007).

Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de conhecer a proporção da integração dos HPV e de determinar o momento em que ocorre, principalmente nos casos do HPV 16 e 18. A frequência das formas lineares do DNA viral em carcinomas é consistentemente elevada, de 100% nos casos de HPV 18 e até 80% nos casos de HPV 16 (Ho *et al.*, 2006).

Durante a replicação, o genoma do HPV encontra-se numa forma circular, episossomal, e é mantido no citoplasma das células basais do epitélio com cerca de 50-100 cópias por célula. Nesta forma episossomal a expressão dos oncogenes virais E6 e E7 é fortemente regulada, com níveis elevados de expressão apenas nas células pós-mitóticas da camada suprabasal do epitélio. Nessas células diferenciadas os oncogenes virais induzem a re-entrada não programada das células na fase S do ciclo celular, com activação da maquinaria de replicação do DNA celular necessária à amplificação do genoma viral, para a produção de novos viriões (Cheng *et al.*, 1995; Pett e Coleman, 2007).

Durante a integração do DNA na célula hospedeira ocorre disrupção do genoma do HPV, nomeadamente na região do gene E2, o que conduz à sobreexpressão das proteínas oncogénicas virais E6 e E7 e à estabilização dos transcritos que as codificam. Os locais de integração do genoma viral encontram-se distribuídos ao longo de toda a sequência da célula hospedeira, não tendo sido identificadas zonas de integração preferencial (Wentzensen *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários trabalhos evidenciaram a importância do estado físico do DNA viral para a progressão e revelaram uma correlação positiva entre a integração do HPV e o desenvolvimento de carcinoma e lesões precursoras (Nagao *et al.*, 2002; Kulmala *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2006; Saunier *et al.*, 2008; Cricca *et al.*, 2009). Outros, falharam na identificação de associações estatisticamente significativas entre os dois parâmetros (Huang *et al.*, 2008).

Alguns estudos (Pirami *et al.*, 1997; Tonon *et al.*, 2001; Peitsaro *et al.*, 2002; Hudelist *et al.*, 2004; Kulmala *et al.*, 2006; Briolat *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008) têm mostrado que, contrariamente ao que é observado para o HPV 18, a linearização do DNA do HPV 16 pode ocorrer numa fase inicial da infecção, e não apenas durante o processo de transformação maligna. Adicionalmente, uma proporção elevada de carcinomas com o HPV sob a forma exclusivamente episossomal demonstraram que a integração do HPV 16 pode não ser essencial à transformação maligna (Hudelist *et al.*, 2004). Relativamente ao HPV 18, sabe-se que a infecção por este vírus conduz, normalmente, a um fenótipo mais agressivo, com uma progressão mais célere do estágio de displasia para carcinoma invasivo (Badaracco *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2006).

Na investigação do estado físico do DNA por PCR em tempo real, este é inferido a partir da razão E2/E6 (ou E2/E7). Esta abordagem baseia-se no conceito de que em infecções com o DNA sob a forma exclusivamente episossomal existem o mesmo número de cópias do gene E2 que do gene E6, originando uma razão igual a 1, enquanto quando o DNA viral se encontra exclusivamente sob a forma integrada gera um razão E2/E6 igual a 0, pela perda do gene E2 durante a integração. Formas mistas, com cópias de DNA de HPV sob a forma episossomal e cópias sob a forma integrada (formas

concomitantes) apresentam uma razão E2/E6 com valores entre 0 e 1 (Ho *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2008).

O conhecimento aprofundado dos mecanismos envolvidos na integração dos HPVVar na célula hospedeira, pode fornecer um marcador de risco de progressão mais específico que os actualmente disponíveis (Gravitt *et al.*, 2008). Neste contexto, um dos objectivos do presente trabalho foi a implementação de uma metodologia que permitisse analisar o estado físico do DNA do HPV 16 e do HPV 18. Pretendeu-se igualmente realizar o estudo de casos, de forma a avaliar o poder de prognóstico deste marcador.

4.3 Expressão de Oncogenes Virais

As proteínas virais E6 e E7 têm importantes funções, não só na replicação do HPV como também na transformação maligna das células epiteliais (McLaughlin-Drubin e Münger, 2009). A principal função da proteína E6 dos HPVVar é a indução da degradação da p53, uma proteína celular supressora de tumores, normalmente expressa em resposta a danos no DNA ou à iniciação não programada da replicação celular. Adicionalmente, a proteína E6 activa a telomerase celular, através da activação da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). Deste modo a proteína E6 é responsável pela inibição da diferenciação e pela imortalização das células (Fehrmann e Laimins, 2003; Boulet *et al.*, 2007). A oncoproteína E7 dos HPVVar contribui para a desregulação do ciclo celular através da indução da degradação proteolítica da pRB, (McLaughlin-Drubin e Münger, 2009).

Actualmente a importância da detecção do RNAm dos oncogenes E6/E7 dos HPVVar encontra-se estabelecida. A correlação positiva entre a percentagem de positividade para os testes de detecção destes transcritos e a gravidade da lesão tem sido reiterada por vários estudos (Sotlar *et al.*, 2004; Cuschieri *et al.*, 2004; Kraus *et al.*, 2004; Lie *et al.*, 2005; Molden *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2006; Kraus *et al.*, 2006; Molden *et al.*, 2006; Castle *et al.*, 2007; Keegan *et al.*, 2009).

Vários estudos têm indicado que a detecção dos transcritos de E6 e E7 pode ser uma ferramenta importante para o acompanhamento de mulheres com infecção por HPVVar, com uma especificidade e valor preditivo maior, do que os que são indicados pela detecção do DNA viral. Por comparação com os testes de DNA, que não diferenciam entre infecções transitórias e infecções com potencial de transformação, os testes de detecção dos RNAm virais oncogénicos parecem apresentar um valor prognóstico superior (Cattani *et al.*, 2009).

Dos trabalhos desenvolvidos até à data podemos constatar que a expressão do RNAm E6/E7 dos HPVVar pode ser um importante marcador para a identificação de mulheres com infecção persistente. Neste contexto, um dos objectivos do presente trabalho foi a implementação de uma metodologia para a quantificação dos transcritos de E7 de HPV 16 e 18.

4.4 Metilação do DNA

A metilação do DNA consiste na transferência de um grupo metilo para um resíduo de citosina, que, quando faz parte de dinucleótidos de citosina-guanidina (CpG), se mantém estável na forma

metilada (Turan *et al.*, 2007). A metilação do DNA afecta a conformação dos nucleossomas numa rede complexa de interacções epigenéticas com metilação, acetilação e desacetilação de histonas, regulando a expressão genética ao nível da cromatina (Bird, 2002; Turan *et al.*, 2007). Apesar da metilação do DNA ser um processo intracelular normal, alterações na metilação do DNA são frequentemente observadas em todas as fases da carcinogénese, incluindo o início da tumorigénese, durante a progressão e a formação de metástases (Jones e Baylin, 2007).

Uma vez que, no caso do cancro do colo do útero, a desregulação da metilação do DNA ocorre no início do processo de transformação, os genes que se encontram metilados na lesão, mas não no tecido normal, podem potencialmente ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença (Jones e Baylin, 2007; Nephew, 2009).

Alterações nos padrões de metilação podem alterar a expressão dos genes e, uma vez que a taxa de metilação é superior à taxa de mutação, é mais provável que o início do processo neoplásico seja provocado por mutações epigenéticas, mais do que por mutações genéticas (Merlo *et al.*, 2006).

Recentemente, foi demonstrado que a metilação do DNA do HPV 16 e 18 ocorre regularmente nas células do colo do útero, quer se tratem de produtos biológicos quer se for em linhas celulares (Badal *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; van Tine *et al.*, 2004; Kalantari *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2006; Bhattacharjee e Gupta, 2006; Turan *et al.*, 2007). Este acontecimento levanta questões relativamente à forma como o genoma de HPV é reconhecido pela maquinaria celular de metilação do DNA e sobre o papel deste mecanismo na replicação viral e na carcinogénese.

Nas células epiteliais indiferenciadas, a metilação dos CpGs do HPV 16 é distribuída e esporádica. A metilação preferencial dos genes tardios sugere um papel na regulação do ciclo viral (Badal *et al.*, 2004). Durante a carcinogénese, após a integração do HPV 16 e 18 no DNA celular, o gene L1, e mais raramente a região LCR, são hipermetilados. O elevado número de cópias de HPV por célula permite que a maioria do DNA viral possa ser hipermetilado e ficar transcricionalmente inactivo, enquanto um ou poucos oncogenes virais, não-metilados e transcricionalmente activos, mantêm o estado transformado da célula infectada (Kalantari *et al.*, 2004; Van Tine *et al.*, 2004; Kalantari *et al.*, 2008).

O gene L1 é um alvo particularmente eficaz da metilação, pelo que a metilação do gene L1 do HPV 16 e 18 pode funcionar como um biomarcador da recombinação entre o DNA viral e o DNA celular, avaliando a menor ou maior probabilidade de uma lesão progredir para carcinoma (Kalantari *et al.*, 2008).

Vários estudos foram desenvolvidos para descrever os padrões de metilação do gene L1 do HPV 18 (Badal *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2007; Kalantari *et al.*, 2008). O estudo da metilação dos CpGs individuais em lesões precursoras e em casos de CCU, permitiu concluir que o gene L1 se encontra preferencialmente hipometilado nas lesões precursoras e hipermetilado nos carcinomas (Turan *et al.*, 2007).

A *Methylation specific PCR* (MSP) é um método de análise da metilação do DNA, baseado na conversão de todas as citosinas não metiladas de uma sequência em uracilos, através do tratamento com bisulfito. Posteriormente, realiza-se uma amplificação com pares de *primers* desenhados exclusivamente para sequências com ou sem CpGs metilados (Herman *et al.*, 1996; Wentzensen *et*

al., 2009). Trata-se de um método sensível, capaz de detectar pequenas quantidades de DNA metilado, mesmo na presença de DNA não metilado em excesso, e vice-versa.

Wentzensen e colaboradores (2009) fizeram uma revisão sistemática da literatura relacionada com a metilação do DNA celular associada ao desenvolvimento do cancro do colo do útero, e concluíram que, até ao momento, não foi possível definir um marcador de metilação com valor preditivo para a progressão das lesões e com aplicação na prática clínica. Os estudos avaliados apresentavam, entre eles, uma grande variedade de frequências de metilação. Diferenças na técnica de análise da metilação, na população estudada (por ex. etnicidade) e nos genótipos do HPV estudados, são algumas das justificações apresentadas para a divergência dos resultados publicados (Wentzensen et al., 2009; Nephew, 2009).

Vários estudos têm revelado padrões de específicos de metilação do DNA do HPV associados aos diferentes tipos de lesão o que indica que este mecanismo afecta profundamente o ciclo viral e a carcinogénese (Badal *et al.*, 2004). Neste contexto, um dos objectivos do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia para o estudo da metilação de CpGs específicos do gene L1 dos HPV 16 e 18.

5. OBJECTIVOS

Tendo como objectivo principal a identificação de marcadores de prognóstico para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

- ❑ Implementação da Quantificação da Carga Viral do HPV 16 e 18
- ❑ Implementação do Estudo do Estado Físico do DNA do HPV 16 e 18
- ❑ Desenvolvimento e Implementação da Quantificação do RNAm E7 do HPV 16 e 18
- ❑ Desenvolvimento do Estudo da Metilação de Regiões Específicas do HPV 16 e 18

MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram consideradas 2893 mulheres pertencentes à casuística do laboratório (2006-2008), com idades compreendidas entre os 14 e os 78 (média = 34 anos; mediana = 32 anos), com ou sem sinais sugestivos de infecção por HPV. A detecção e tipificação do HPV foi efectuada, por solicitação do médico assistente, em produtos biológicos colhidos no colo do útero.

De acordo com o diagnóstico citopatológico e a informação clínica disponível, foram definidos cinco grupos: observação clínica, citológica e colposcópica normal (normal), alteração de significado indeterminado (ASCUS), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma do colo do útero (CCU).

2. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico, obtido durante a observação ginecológica, consistiu em células epiteliais do colo do útero colhidas por *cytobrush*, por zaragatoa ou pelo método de citologia em meio líquido, e em alguns casos, em fragmentos de tecidos colhidos por biopsia, orientada por colposcopia. Os produtos biológicos foram conservados a 4°C, por um período de 48 horas, ou a -20°C, por períodos de tempo superiores, até extracção dos ácidos nucleicos.

3. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

3.1. Extracção de DNA

A extracção manual de DNA foi realizada através do sistema comercial *CLART® Papilomavírus Humano 2* (Genomica, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.genomica.es/media/docs/CLART%20HPV2.%20V6%20inglés1.pdf>).

3.2. Detecção e Tipificação do HPV

Para a detecção e tipificação do HPV foi utilizado o sistema comercial *CLART® Papilomavírus Humano 2* (Genomica, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.genomica.es/media/docs/CLART%20HPV2.%20V6%20inglés1.pdf>).

3.3. Métodos de Confirmação da Infecção por HPV

3.3.1. Purificação de produtos da PCR

Os produtos amplificados foram purificados, de modo a remover os *primers* e nucleótidos em excesso, através do sistema comercial *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A quantificação relativa e a avaliação do grau de pureza do DNA foi realizada por electroforese em gel de agarose.

3.3.2. Electroforese em gel de agarose

A separação e visualização dos produtos da PCR convencional, PCR em tempo real e produtos purificados da PCR foi realizada por electroforese em gel de agarose 2,5% em TAE 1x. À solução de agarose foi adicionado *GelRed* 10.000x na proporção 1:50.000 (Biotium, Hayward, CA). Após a electroforese, a visualização foi realizada num transiluminador de ultravioleta (UV) (Gel Doc 2000, Biorad, software Quantity One 4.3.0, BioRad).

3.3.3. Preparação da reacção de sequenciação

A reacção de sequenciação foi realizada de acordo com o descrito pelo fabricante do sistema *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada produto a sequenciar, a mistura de reacção continha 3,5 µl de Tampão *BigDye* (Applied Biosystems), 0,5 µl de *BigDye Terminator* (Applied Biosystems), 1 µl de um dos *primers* na concentração desejada e 1-5 µl de DNA purificado. A quantidade de DNA aplicada na reacção variou consoante a sua concentração, inferida a partir da electroforese pós-purificação. O volume final de 10 µl foi completado com água estéril (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O termociclador (*GeneAmp PCR System 9700*, Applied Biosystems) foi programado para os seguintes ciclos de temperaturas: 25 ciclos de 10" a 96°C, 5" a 50°C e 4' a 60°C.

3.4. Análise de sequências de DNA

As sequências de nucleótidos foram visualizadas através do programa Chromas v1.45, e analisadas e comparadas com as sequências de referência disponíveis no GenBank. Os alinhamentos foram realizados através do programa MEGA v4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007).

4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HPV 16 E 18

Para a quantificação do DNA foi utilizado o procedimento experimental descrito por Carcopino e colaboradores (2006), o qual consistia numa PCR *duplex* em tempo real, com algumas alterações. Foram utilizados *primers* e sondas *Taqman* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específicas para o gene E6 do HPV 16, para o gene E6 do HPV 18 e para o exão 12 do gene da albumina humana (Tabela I). As sondas para os HPV 16 e 18 e para a albumina foram marcadas com o fluorocromo repórter FAM e VIC, respectivamente.

Para testar os *primers* da PCR em tempo real, foi realizada uma PCR convencional nas seguintes condições: para um volume final de 50 µl, foram utilizados 5 µl *Taq Buffer* 10x, 0,2 µM de cada dNTP, 1 mM de MgCl₂, 200 nM de cada *primer*, 1,25 U de polimerase de DNA (*AmpliTaq DNA Polymerase*, Applied Biosystems) e 5 µl de DNA. As condições de amplificação foram: 5' a 95°C, 40 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 66°C e 1' a 72°C, seguidos de 10' a 72°C. Em cada PCR foram incluídos controlos positivos (positivo para o HPV em estudo) e controlos negativos (água). Os produtos da PCR foram visualizados por electroforese, purificados e sequenciados conforme descrito no ponto 3.3.

Tabela I - *Primers* e Sondas para a PCR em tempo real.

<i>Primer</i> *	Sequência (5' - 3')	Localização ^a	Tamanho do produto (pb)
Q16-F	CTA AGG GCG TAA CCG AAA TCG	24-44	
Q16-R	AAC TGT GGT AAC TTT CTG GGT CG	125-147	124
Q16-S	AGA ACT GCA ATG TTT CAG GAC CCA CAG G	95-122	
Q18-F	AAA AAC GAC GAT TTC ACA ACA TAG C	472-496	
Q18-R	GTC GTT GGA GTC GTT CCT GTC	541-561	90
Q18-S	TCG GTT GCA GCA CGA ATG GCA	516-536	
QA1b-F	GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T	74284554-74284575	
QA1b-R	AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT TC	74284672-74284694	141
QA1b-S	CCT GTC ATG CCC ACA CAA ATC TCT CC	74284611-74284636	

F, *primer forward*; R, *primer reverse*; S, sondas; pb, pares de base. *, Carcopino *et al.*, 2006. ^a, Região a amplificar na sequência de referência do HPV 16 (NC_001526.1), HPV 18 (NC_001357.1) e cromossoma 4 de *Homo sapiens* (NC_000004.11).

A mistura de reacção da PCR em tempo real continha *Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems), 10 pmol/μl de cada um dos *primers*, 5 pmol/μl de cada sonda (Applied Biosystems) e 50 ng de DNA, para um volume final de 25 μl. A concentração de DNA das amostras foi determinada por leitura da absorvância a 260 nm.

As reacções de quantificação foram realizadas num *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). O programa de amplificação consistiu em 2' a 50°C e 45 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C.

Para a construção das rectas de calibração para o HPV 16, HPV 18 e albumina, foram utilizados três controlos de concentração conhecida: o genoma completo do HPV 16 (*HPV 16 DNA for Real Time PCR*, Clonit, Milão, Itália) e o genoma completo do HPV 18 (*HPV 18 DNA for Real Time PCR*, Clonit) nas diluições 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴, 1x10³ e 1x10² cópias/μl, e o DNA humano (*Human Genomic DNA*, Roche, Mannheim, Alemanha) nas diluições 3x10⁵, 3x10⁴, 3x10³, 3x10² e 3x10¹ cópias/μl.

Foram incluídos em todos os ensaios controlos positivos (*HPV 16 e HPV 18 DNA for Run Control*, Clonit) e controlos negativos (água). Em cada ensaio, os controlos e as amostra foram aplicados, pelo menos, em duplicado.

A carga viral, expressa como o número de cópias do HPV 16 ou do HPV 18 por milhão de células humanas, foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Carga viral (cópias HPV/10}^6 \text{ células)} = \frac{\text{Número de cópias do HPV}}{\text{Número de cópias de Albumina} / 2} \times 10^6$$

5. ESTUDO DO ESTADO FÍSICO DO DNA DO HPV 16 E 18

Para o estudo do estado físico do DNA do HPV 16 e 18 foi utilizado o procedimento experimental descrito por Huang e colaboradores (2008), o qual consistia numa PCR em tempo real para quantificação simultânea dos genes E2 e E6 (Tabela II).

As misturas de reacção, preparadas para um volume final de 25 µl, continham 1x SYBR® GreenER™ qPCR Supermix for ABI PRISM® (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,1 µM dos primers para a região E2 ou para a região E6 e 50 ng de DNA total. A reacção foi realizada no aparelho ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram as seguintes: 10' a 95°C e 45 ciclos de 10" a 95°C e 1' a 60°C.

Para a construção das rectas de calibração para o HPV 16 e para o HPV 18 foram utilizados dois controlos de concentração conhecida: o genoma completo do HPV 16 e o genoma completo do HPV 18 nas diluições 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴, 1x10³ e 1x10² cópias/µl. Em todos os ensaios foram incluídos controlos positivos e negativos.

A especificidade da amplificação foi avaliada através da realização de curvas de desnaturação e da visualização dos produtos da PCR, por electroforese em gel de agarose a 2,5% em TAE 1x.

Tabela II - Primers para a PCR em tempo real.

Primer*	Sequência (5' – 3')	Localização ^a	Tamanho do produto (pb)
16E2-F	AAT TAT TAG GCA GCA CTT GGC CA	3445-3467	101
16E2-R	ATC TTG GTC GCT GGA TAG TCG TCT	3522-3545	
16E6-F	GAG CGA CCC AGA AAG TTA CCA C	122-143	107
16E6-R	ACC TCA CGT CGC AGT AAC TGT TG	206-228	
18E2-F	CCG CTA CTC AGC TTG TTA AAC AGC T	3454-3478	97
18E2-R	GCC GAC GTC TGG CCG TAG	3533-3550	
18E6-F	CGG CGA CCC TAC AAG CTA CC	129-148	107
18E6-R	ACC TCT GTA AGT TCC AAT ACT GTC TTG C	235-208	

F, primer forward; R, primer reverse; pb, pares de base. * Ho *et al.*, 2006. ^a, Região a amplificar na sequência de referência do HPV 16 (NC_001526.1) e do HPV 18 (NC_001357.1).

O estado físico do DNA viral foi classificado como episomal quando E2/E6 ≥ 1,000, como concomitante quando 0,000 < E2/E6 < 1,000 e como integrado quando E2/E6 = 0,000.

6. DETECÇÃO DO RNAm DOS ONCOGENES VIRAIS E6/E7 DOS HPV 16, 18, 31, 33 E 45

6.1. Extracção de Ácidos Nucleicos

No processo de extracção dos ácidos nucleicos foi utilizado o sistema comercial NucliSENS® miniMag® (BioMérieux, Boxtel, Holanda), de acordo com as instruções do fabricante (http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_79). Os ácidos nucleicos eluídos foram conservados a -70°C.

6.2. Detecção do RNAm por NASBA

Para a amplificação e detecção do RNAm dos oncogenes virais E6/E7 dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45 foi utilizado o sistema comercial NucliSENS® EasyQ® HPV v1.0 (BioMérieux), o qual consiste numa reacção de Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), com detecção qualitativa dos

transcritos de RNAm e análise dos resultados por um leitor específico. A reacção foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_4). Para validar a integridade do RNA utilizado na reacção, o ensaio amplifica simultaneamente o RNAm do gene U1A, um gene *housekeeping* humano.

7. QUANTIFICAÇÃO DO RNAm E7 DO HPV 16 E 18

Inicialmente, foram utilizados os *primers* descritos por Scheurer e colaboradores (2007). Para a confirmação da sequência amplificada foi realizada uma PCR convencional, seguida de purificação dos produtos e sequenciação, conforme descrito no ponto 3.3. As condições foram as seguintes: para um volume final de 50 µl foram utilizados 5 µl *AmpliTaq DNA Polymerase Buffer* 10x (Applied Biosystems), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Gibco, Eggenstein, Alemanha), 1,5 U de *AmpliTaq DNA Polymerase* (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada *primer* e 5 µl de DNA. O programa de amplificação usado foi: 5' a 95°C, 35 ciclos de 30'' a 95°C, 30'' a 64°C e 1' a 72°C, seguidos de 10' a 72°C.

A PCR convencional permitiu obter os fragmentos desejados e a sequência nucleotídica, obtida por sequenciação, confirmou a correcta amplificação do amplicão. No entanto, a utilização destes dois pares de *primers* na PCR em tempo real, revelou, para além do fragmento esperado, amplificações de fragmentos inespecíficos. Esta inespecificidade foi evidenciada pela ausência de um pico nítido na curva de desnaturação, realizada no fim do ensaio da PCR em tempo real, e da presença de uma banda adicional e inesperada, quando se realizou electrorese em gel de agarose dos produtos do ensaio. Assim, foram desenhados novos *primers*, para amplificação das sequências a estudar.

Os *primers* para a amplificação de E7 do HPV 16 e 18 foram desenhados com o software *ABI Prism® Primer Express* (Applied Biosystems). Os *primers* escolhidos (Tabela III) foram submetidos a emparelhamento com as sequências de referência no *GenBank* e a especificidade para a sequência alvo foi avaliada recorrendo ao programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

Tabela III - *Primers* desenhados para a quantificação do RNAm de E7 do HPV 16 e 18.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Localização ^a	Tamanho do produto (pb)
RNA16-F	CCG GAC AGA GCC CAT TAC AAT	700-720	82
RNA16-R	CGT GTG TGC TTT GTA CGC ACA	761-781	
RNA18-F	CCG AAC CAC AAC GTC ACA CAA	750-770	97
RNA18-R	AAT GCT CGA AGG TCG TCT GCT	826-846	

F, *primer forward*; R, *primer reverse*; pb, pares de base. ^a, Região a amplificar na sequência de referência do HPV 16 (NC_001526.1) e HPV 18 (NC_001357.1).

Para a quantificação dos transcritos virais, foram utilizados os ácidos nucleicos extraídos com o sistema comercial NucliSENS® miniMag® (BioMérieux, Holanda).

Para a remoção do DNA contaminante, procedeu-se à incubação de 10 µl de ácidos nucleicos com 2 U de *DNase I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) num volume de reacção de 25 µl, durante uma hora a 37°C. A inactivação da *DNase I* foi obtida por incubação do produto com 25 mM EDTA a 75°C durante 10 min.

O RNA assim obtido foi quantificado por leitura da absorvância a 260 nm. Nos casos em que a leitura de absorvância indicou concentrações de RNA inferiores a 8 ng/µl, o tratamento foi repetido. Os casos em que foi impossível obter concentrações de RNA superiores a 8 ng/µl, foram excluídos do estudo, por se considerar que a qualidade da amostra não era suficiente para prosseguir.

A síntese de cDNA foi realizada através do *SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA), segundo o protocolo do fabricante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/vilo_cdna_synthesis_man.pdf). Resumidamente, a 4 µl de *5x VILO Reaction Mix* e 2 µl de *10x Superscript Enzyme Mix* foram adicionados 100 ng de RNA tratado e água, para um volume final de 20 µl.

Para avaliar e excluir possíveis contaminações do RNA com DNA, foram incluídos controlos sem transcriptase reversa em todos os ensaios, em que a *10x Superscript Enzyme Mix* foi substituída por água. A transcrição reversa foi efectuada num termociclador (*GeneAmp PCR System 9700*, Applied Biosystems) nas seguintes condições: 10' a 25°C, 60' a 42°C e 5' a 85°C.

A quantificação por PCR em tempo real do RNAm do HPV 16 e 18 foi realizada recorrendo ao aparelho *ABI Prism® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

A mistura de reacção, preparada para um volume final de 25 µl, continha *1x SYBR® GreenER™ qPCR Supermix for ABI PRISM®* (Invitrogen), 0.1 µM dos *primers* RNA 16-F e RNA 16-R ou dos *primers* RNA 18-F e RNA 18-R, e 5 µl de cDNA. As condições de amplificação foram as seguintes: 10' a 95°C e 45 ciclos de 10" a 95°C e 1' a 60°C.

Para a construção das rectas de calibração foram utilizados dois controlos de concentração conhecida: o genoma completo do HPV 16 e o genoma completo do HPV 18, nas diluições 1x10⁶, 1x10⁵, 1x10⁴, 1x10³ e 1x10² cópias/µl foram incluídos controlos positivos e negativos em todos os ensaios. Os controlos e as amostras foram aplicados, pelo menos, em duplicado.

A especificidade da amplificação foi verificada através da realização de curvas de desnaturação e da visualização dos produtos da PCR por electroforese em gel de agarose a 2,5% em TAE 1x.

8. ESTUDO DA METILAÇÃO DO GENE L1 DO HPV 16 E 18

A aplicação da técnica de MSP ao estudo da metilação de CpGs no gene L1 de HPV 16, não se encontra descrita. Assim, foi necessário desenhar *primers* específicos para as sequências metiladas e não metiladas deste gene, convertidas com bisulfito, através do software *Methyl-Primer Express v1.0* (Applied Biosystems). No entanto, durante este processo verificou-se que o número e a distribuição dos CpGs no gene L1 do HPV 16 não permite a construção de *primers* para a

diferenciação por MSP da metilação de CpGs específicos nesta região. Assim, e por inviabilidade do procedimento, abandonou-se o estudo da metilação do gene L1 de HPV 16.

Para o estudo da metilação de CpGs no gene L1 do HPV 18 por MSP seguiu-se o protocolo descrito por Turan e colaboradores (2007), com as algumas alterações.

Para a produção de controlos metilados e não metilados da região em análise, foi construído um plasmídeo contendo um fragmento de 481 pb, que abrangia parte da região L1 e da região LCR do HPV 18.

Os *primers* utilizados para produzir o fragmento a clonar (Tabela IV) foram desenhados através do programa *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) com base na sequência de referência do HPV 18 (NC_001357.1).

Tabela IV - *Primers* desenhados para a amplificação de um fragmento do gene L1 e da LCR do HPV 18.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Localização ^a	Tamanho do produto (pb)
18L1clon-F	CTG TCA AAA GGA TGC TGC AC	6896-6915	481
18L1clon-R	ATA GCC CAA CAA GCA ACA CC	7357-7376	

F, *primer forward*; R, *primer reverse*; pb, pares de base. ^a, Região a amplificar na sequência de referência do HPV 18 (NC_001357.1).

Para a construção do plasmídeo foi realizada uma PCR com os *primers* 18L1clon-F e 18L1clon-R, de forma a obter várias cópias da região em estudo. O processo de clonagem foi iniciado através do sistema comercial *TOPO® TA Cloning Kit* (vector pCR®2.1, Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf). As colónias brancas (transformantes) foram seleccionadas e transferidas, cada uma, para um tubo contendo 4 ml de meio LB com canamicina. Após incubação a 37°C com agitação durante a noite, 2 ml de cada cultura foram transferidos para novos tubos. Em seguida, o conteúdo de um dos tubos foi conservado em TBE+Glicerol (20%), a -80°C, enquanto que a suspensão bacteriana do segundo tubo foi sujeita à extracção de ácidos nucleicos, através do método da fervura. Com o DNA extraído foi realizada uma PCR com os *primers* M13F: 5'-GTAAACGACGGCCAG-3' e M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Posteriormente, os produtos da PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose. Os produtos em que se confirmou a integração do fragmento foram sequenciados e 5 µl das colónias positivas, previamente conservadas a -80°C em TBE+Glicerol, foram utilizados para inocular novos tubos, contendo 4 ml de meio LB com canamicina. Após incubação a 37°C com agitação durante a noite, os plasmídeos foram purificados através do sistema comercial *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink%20_quick_plasmid_qrc.pdf). As concentrações das alíquotas do plasmídeo foram medidas por espectrofotometria.

Após confirmação, por PCR e sequenciação, da presença e orientação da sequência desejada no plasmídeo extraído, procedeu-se à sua linearização, de forma a prepará-lo para os tratamentos

enzimáticos seguintes. A escolha do enzima de restrição para clivagem do plasmídeo num único local foi feita no programa *NEB Cutter v2.0* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Posteriormente, 1 µg de plasmídeo foi clivado com 2 U de *Hind III* numa reacção de 25 µl (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). A incubação e a inactivação do enzima foram realizadas num termociclador durante 60' a 37°C e 15' a 65°C, respectivamente. A confirmação da linearização do plasmídeo foi realizada por electroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1x.

Em seguida, uma alíquota do plasmídeo linearizado foi tratada com 4 U de *CpG Methyltransferase* (M.SssI, New England Biolabs) e S-adenosilmetionina a 600 µM, numa reacção de 20 µl. A incubação e a inactivação do enzima foram realizadas num termociclador durante 60' a 37°C e 20' a 65°C, respectivamente. Este tratamento permite metilar todos os C que precederem os G nas sequências de DNA.

Após a metilação, alíquotas do plasmídeo linearizado, metilado (cerca de 200 ng) e não metilado (cerca de 500 ng), foram tratadas com o *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit*, segundo as instruções do fabricante (Zymo Research, Orange, CA, EUA) (<http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D5005i.pdf>). Num termociclador foram realizados os passos de desnaturação, 10' a 98°C, e de incubação, 2,5 horas a 64°C. Este tratamento visa converter todas os C não metilados, presentes no DNA, em T. Os C que estão antes dos G, quando metilados, não são convertidos. Deste modo, o plasmídeo metilado artificialmente apenas manterá os C que se encontram antes dos G, e verá todos os restantes C da sequência convertidos em T. No plasmídeo não metilado todos os C serão substituídos por T.

Tabela V - *Primers* para a MSP.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Localização ^a
18L1met-F	GGT TTA GGT TGG ATT GCG TC	7022-7041
18L1met-R	TCC TAA CAC GTA CAC GCA CAC	7111-7131
18L1unmet-F	TTT TTG GTT TAG GTT GGA TTG TGT TGT	7017-7043
18L1unmet-R	CAT ATT ACT TCC TAA CAC ATA CAC ACA CAC AC	7109-7140

F, *primer forward*; R, *primer reverse*; pb, pares de base. * Turan *et al.*, 2007. ^a, Região a amplificar na sequência de referência do HPV 18 (NC_001357.1).

Após a conversão CT, procedeu-se à MSP, para amplificação das sequências metiladas e não metiladas com ambos os pares de *primers* (Tabela V). Para um volume final de 50 µl foram adicionados 1x *AmpliTaq Gold® Buffer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 U de polimerase de DNA (*AmpliTaq DNA Polymerase*, Applied Biosystems) e 2 µl de DNA. As condições de amplificação foram: 9' a 94°C e 40 ciclos de 30'' a 95°C e 75'' a 68°C, seguidos de 7' a 68°C. Em cada PCR foram incluídos controlos negativos (água). O resultado da MSP foi visualizado por electroforese em gel de agarose 2,5% em TAE 1x. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados, conforme descrito no ponto 3.3, para confirmação.

Na presença de bandas inespecíficas, foram realizadas novas MSP a partir do produto da primeira, com ambos os pares de *primers*. As condições da reacção foram mantidas. Nos casos em que a segunda amplificação foi específica, foi possível constatar que a inespecificidade na amplificação resultou da mistura de sequências de DNA na amostra e não da inespecificidade dos *primers* para a sequência alvo.

9. TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados obtidos foram inseridos e trabalhados numa base de dados criada em *Microsoft Office Excel 2003 for Windows* (Microsoft Corporation, Redmond, EUA). A análise estatística de dados foi realizada segundo o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS v16.0).

A reprodutibilidade dos ensaios de PCR em tempo real foi analisada através do cálculo dos coeficientes de variação (CV) intra-ensaio (réplicas no mesmo ensaio) e inter-ensaio (réplicas em ensaio diferentes). O coeficiente de variação (CV) foi calculado pela razão do desvio padrão sobre a média, multiplicada por 100. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram considerados muito bons quando inferiores a 4% e 20%, respectivamente.

10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O coeficiente de correlação de *Pearson* foi utilizado para explorar a associação entre variáveis de escala. Para explorar a associação entre variáveis de diferentes categorias (de escala, ordinais e nominais) foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman* (*Rho*). Valores *two-sided* de $\rho \leq 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

1. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV

1.1 Descrição da População Considerada

Foram consideradas 2893 mulheres, pertencentes à casuística do laboratório, com idades compreendidas entre os 14 e os 78 (média = 34 anos; mediana = 32 anos), com ou sem sinais sugestivos de infecção por HPV.

Esses 2893 casos foram agrupados de acordo com o diagnóstico citopatológico e a informação clínica disponível em cinco grupos: normal (n=1454), ASCUS (n=741), LSIL (n=510), HSIL (n=176) e CCU (n=12).

Tabela VI - Distribuição da proporção da infecção por HPV nas mulheres consideradas para o estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.

	Normal n=1454	ASCUS n=741	LSIL n=510	HSIL n=176	CCU n=12	Total n=2893
HPV -vo	988 (68,0)	465 (62,8)	152 (29,8)	28 (15,9)	0	1633 (55,9)
HPV +vo	466 (32,0)	276 (37,2)	358 (70,2)	148 (84,1)	12 (100,0)	1260 (43,1)
Simples	300 (64,4)	174 (63,0)	210 (58,7)	107 (72,3)	11 (91,7)	802 (63,7)
HPV ar	191 (41,0)	118 (42,8)	164 (45,8)	100 (67,6)	11 (91,7)	584 (46,3)
HPV br	109 (23,4)	56 (20,3)	46 (12,8)	7 (4,7)	0	218 (17,3)
Mista	166 (35,6)	102 (37,0)	148 (41,3)	41 (27,7)	1 (8,3)	458 (36,3)
ar+ar	68 (14,6)	47 (17,0)	51 (14,2)	24 (16,2)	1 (8,3)	191 (15,2)
ar+br	79 (17,0)	50 (18,1)	89 (24,9)	17 (11,5)	0	235 (18,7)
br+br	19 (4,1)	5 (1,8)	8 (2,2)	0	0	32 (1,1)

Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero; HPV ar, Vírus do Papiloma Humano de alto risco; HPV br, Vírus do Papiloma Humano de baixo risco; ar+ar, Infecção mista por genótipos de alto risco; ar+br, Infecção mista por genótipos de alto e de baixo risco; br+br, Infecção mista por genótipos de baixo risco. Os valores em percentagem são apresentados entre parêntesis.

Considerando os casos positivos, HPV ar foram identificados em 72,6% dos casos normais, 77,9% dos ASCUS, 84,9% dos LSIL, 95,3% dos HSIL e 100,0% dos CCU. O inverso foi observado relativamente à identificação de HPV br em 44,5% dos casos normais, 40,2% dos ASCUS, 39,9% dos LSIL, 16,2% dos HSIL e 0,0% dos CCU. Foi observado um aumento significativo da proporção dos HPV ar e uma diminuição significativa dos HPV br em função da gravidade das lesões ($\alpha=0,01$; $p=0,000$).

Considerando os casos positivos, HPV 16 foi identificado em 22,7% dos casos de citologia normal, 22,8% dos ASCUS, 18,9% dos LSIL, 51,0% dos HSIL e 66,7% dos CCU. HPV 18 foi identificado em 4,3% dos casos de citologia normal, 8,3% dos ASCUS, 5,8% dos LSIL, 6,0% dos HSIL e 25% dos CCU.

Relativamente às infecções simples, o genótipo mais frequente foi o HPV 16 (14,7%), seguido do HPV 31 (6,4%), HPV 6 (5,2%), HPV 53 (5,0%), HPV 58 (4,1%), HPV 66 (3,2%), HPV 18 e 61 (2,7% cada) e HPV 51 (2,5%).

As infecções por múltiplos tipos de HPV foram mais frequentes nas mulheres com LSIL (41,3%) e nas mulheres com citologias suspeitas (37,0%). Neste tipo de infecções foram identificadas três associações, HPV ar+ar, ar+br, br+br. A associação ar+ar foi mais frequente nas citologias HSIL, enquanto que a associação ar+br foi mais frequente nas citologias LSIL e a associação br+br foi mais frequente em citologias normais.

1.2 Descrição da População Estudada

Para o estudo em questão foram seleccionadas 196 mulheres, com infecção por HPV 16 e/ou HPV 18. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal (n=57), ASCUS (n=44), LSIL (n=47), HSIL (n=40) e CCU (n=8).

Na selecção das mulheres para o estudo pesaram factores como o genótipo de HPV identificado, o volume de amostra, DNA ou ácidos nucleicos disponível, o diagnóstico citopatológico e a informação clínica adicional.

Tabela VII - Distribuição da proporção da infecção por HPV nas mulheres incluídas no estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.

	Normal n=57	ASCUS n=44	LSIL N=47	HSIL n=40	CCU n=8	Total n=196
Simple	35 (61,4)	27 (61,4)	28 (59,6)	29 (72,5)	8 (100,0)	127 (64,8)
HPV 16	28 (49,1)	17 (38,6)	19 (40,4)	26 (65,0)	5 (62,5)	95 (48,5)
HPV 18	7 (12,3)	10 (22,7)	9 (19,1)	3 (7,5)	3 (37,5)	32 (16,3)
Mista	22 (38,6)	17 (38,6)	19 (40,4)	11 (27,5)	0	69 (35,2)
HPV 16+18	2 (3,5)	1 (2,3)	0	2 (5,0)	0	5 (2,6)
HPV 16+ar	10 (17,5)	7 (15,9)	4 (8,5)	4 (10,0)	0	25 (12,8)
HPV 16+br	6 (10,5)	2 (4,5)	8 (17,0)	4 (10,0)	0	20 (10,2)
HPV 18+ar	4 (7,0)	4 (9,1)	5 (10,6)	1 (2,5)	0	14 (7,1)
HPV 18+br	0	3 (6,8)	2 (4,3)	0	0	5 (2,6)

Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero; Simple, Infecção simples por HPV 16 ou por HPV 18; Mista, Infecção por pelo menos dois tipos de HPV; HPV 16+18, Infecções mistas por HPV 16 e por HPV 18; HPV 16+ar, HPV 18+ar, Infecções mistas por HPV 16 ou por HPV 18 e pelo menos um HPV de alto risco; HPV 16+br, HPV 18+br, Infecções mistas por HPV 16 ou por HPV 18 e pelo menos um HPV de baixo risco. Os valores em percentagem são apresentados entre parêntesis.

2. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HPV 16 E 18

2.1 Implementação da Quantificação da Carga Viral do HPV 16 e 18 por PCR em Tempo Real

O ensaio de quantificação do HPV 16 desenvolvido permitiu quantificar 3 a 1×10^{13} cópias de HPV por 10^6 células. O ensaio de quantificação do HPV 18 permitiu quantificar de 1 a 1×10^{12} cópias de HPV por 10^6 células.

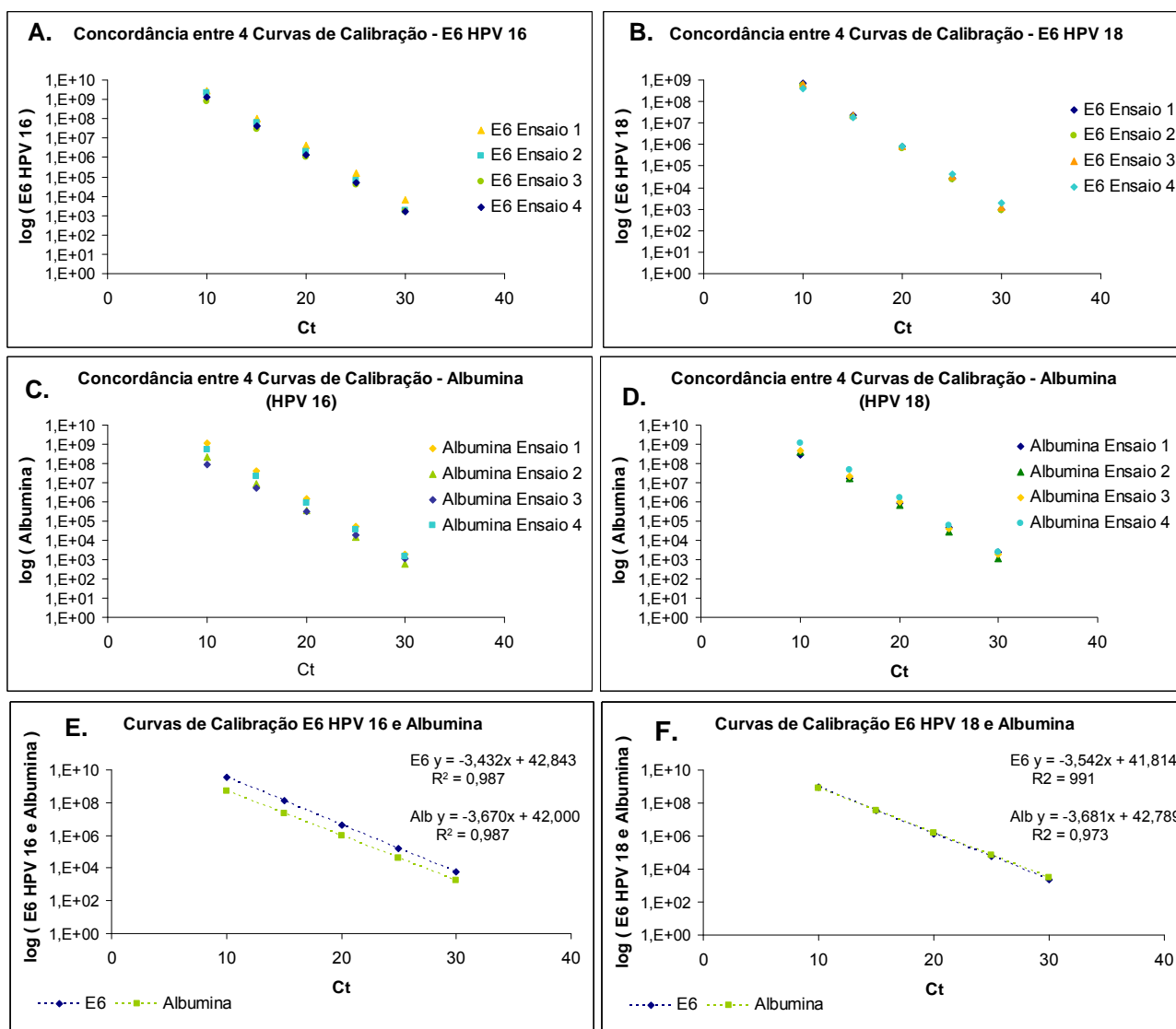


Figura 2: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação da carga viral (A), (B), (C), Correlação entre os pontos gerados para cada um dos amplicões, nas várias concentrações de calibradores, entre os vários ensaios. (E) E mostra as curvas de calibração médias calculadas para a amplificação do gene E6 e do gene da albumina nos ensaios de quantificação da carga viral de HPV 16. (F) F mostra as curvas de calibração médias calculadas para a amplificação do gene E6 e para o gene da albumina nos ensaios de quantificação da carga viral de HPV 18. As equações da recta para cada amplicão são apresentadas. Ct, *Cycle threshold*, número do ciclo de temperatura num ensaio de PCR em tempo real em que a fluorescência gerada pela reacção ultrapassa o limiar definido.

A eficiência dos *primers* utilizados foi determinada pela equação:

$$\text{Eficiência} = \left(\frac{-1}{\text{declive}} \right) - 1$$

A eficiência dos *primers* nos ensaios de quantificação da carga viral de HPV 16 foi de 95,6% para o E6 do HPV 16 e 87,3% para a albumina, enquanto que para o HPV 18 foi de 91,6% e 86,9%, respectivamente.

Os ensaios de PCR em tempo real foram analisados quanto à reprodutibilidade intra- e inter-ensaios. A concordância entre os pontos de dados gerados para os amplicões do gene E6 e da albumina, nos ensaios de quantificação do HPV 16 e 18, foi, regra geral, elevada (Figura 1).

O CV intra-ensaio foi de 0,9% (mínimo 0,33% e máximo 1,57%) para o E6 e 1,3% (0,78-2,57) para a albumina nos ensaios de quantificação da carga viral do HPV 16, enquanto que para o HPV 18 foi de 0,8% (0,41-1,43) para o E6 e 1,3% (0,36-2,55) para a albumina nos ensaios de quantificação da carga viral do HPV 18. O CV inter-ensaio foi de 2,0% (1,10-2,89) para o E6 e 2,6% (1,01-5,67) para a albumina nos ensaios de quantificação da carga viral do HPV 16 e de 1,4% (0,95-2,57) para o E6 e 2,4% (1,30-3,93) para a albumina nos ensaios de quantificação da carga viral do HPV 18.

A reprodutibilidade da técnica nas amostras foi avaliada através da comparação dos resultados de carga viral entre as réplicas de uma mesma amostra, num mesmo ensaio e em ensaios diferentes. Os valores de carga viral calculados para a mesma amostra num mesmo ensaio apresentaram correlação de 98,2% para as réplicas de HPV 16 e de 99,9% para as réplicas de HPV 18. Entre ensaios, a correlação foi de 93,1% para o HPV 16 e de 99,9% para o HPV 18.

Conclui-se que, apesar da eficiência dos *primers* utilizados não ter sido óptima, dado que o coeficiente variação intra- e inter-ensaios e a variabilidade na quantificação da carga viral são baixos, a reprodutibilidade do ensaio é boa.

2.2. Avaliação da Correlação entre a Carga Viral do HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão

2.2.1 Quantificação da carga viral do HPV 16

Foram estudadas 102 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 16. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos quatro grupos: normal (n=38), ASCUS (n=21), LSIL (n=25) e HSIL (n=18).

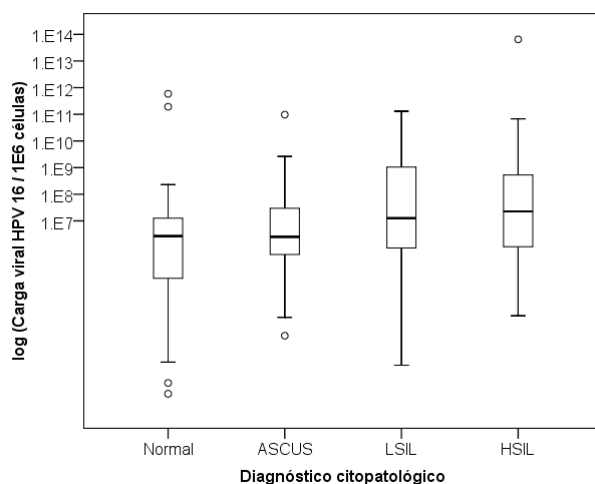


Figura 3: Relação entre a carga viral do HPV 16 e o diagnóstico citopatológico Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau. *, *Outlier*, °, Provável *outlier*.

Por análise dos resultados obtidos, foi possível verificar que os valores da carga viral variaram várias ordens de magnitude em todos os grupos de diagnóstico citopatológico. Os valores obtidos no grupo das citologias normais foram os mais heterogêneos, tendo-se observado, inclusivé, dois dos valores de carga viral mais elevados neste grupo ($>10^{11}$). Excluindo estes casos, e tendo em conta os valores medianos, verificou-se que a carga viral aumenta em função do grau da lesão (Figura 2), ($\alpha=0,05$; $p=0,012$).

A carga viral do HPV 16 parece ser influenciada pela idade das mulheres e o facto da infecção ser simples ou mista. Os resultados foram agrupados de acordo com a idade em mulheres com idade das mulheres em estudo, inferior a 30 e superior a 30 anos, ou de acordo com a detecção de infecção simples ou mista. Através desta análise foi possível observar que a carga viral do HPV 16 quantificada foi em média superior em mulheres abaixo dos 30 anos ($\alpha=0,05$; $\rho=0,01$) e em mulheres com infecção simples ($\alpha=0,05$; $\rho=0,036$).

2.2.2 Quantificação da carga viral do HPV 18

Foram estudadas 49 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 18. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal (n=13), ASCUS (n=18), LSIL (n=11) e HSIL (n=4) e CCU (n=3).

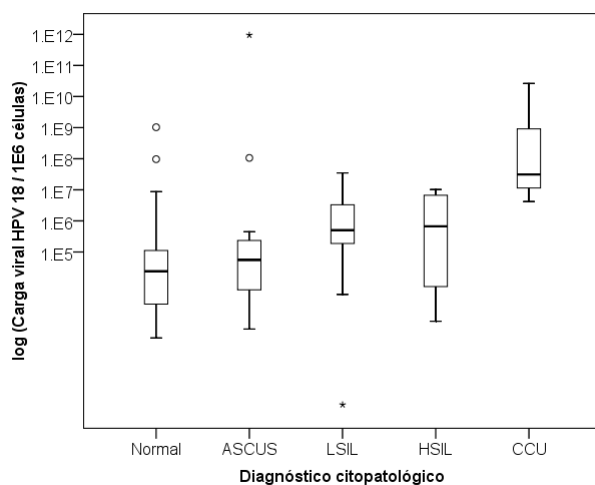


Figura 4: Relação entre a carga viral do HPV 18 e o diagnóstico citopatológico. Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero. *, *Outlier*; °, Provável *outlier*.

Os resultados obtidos para a quantificação da carga viral de HPV 18 indicam um aumento da carga viral em função do grau da lesão (Figura 3). A correlação é significativa ($\alpha=0,01$; $\rho=0,008$).

Tal como para o HPV 16, os valores de carga viral obtidos para as citologias normais e para as alterações de significado indeterminado são aqueles que apresentam maior variabilidade nos resultados. As medianas dos valores de carga viral nos diferentes grupos citopatológicos permitem agrupar os grupos em citologias sem lesão (normais e ASCUS), citologias com lesão (LSIL e HSIL) e casos de CCU.

3. ESTUDO DO ESTADO FÍSICO DO DNA DO HPV 16 HPV 18

3.1 Implementação do Estudo do Estado Físico do DNA do HPV 16 e 18 por PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real para o estudo do estado físico do HPV 16 permitiu quantificar 23 a 2×10^7 cópias de E2 e 3 a $1,5 \times 10^8$ cópias de E6. A PCR em tempo real para o estudo do estado físico do HPV 18 permitiu quantificar 1 a 5×10^5 cópias de E2 e 1 a 7×10^7 cópias de E6.

A concordância e linearidade entre os pontos de dados gerados para os amplicões de E2 e E6 nos diferentes ensaios é, regra geral, elevada, tanto para o HPV 16 como para o HPV 18 (Figura 4).

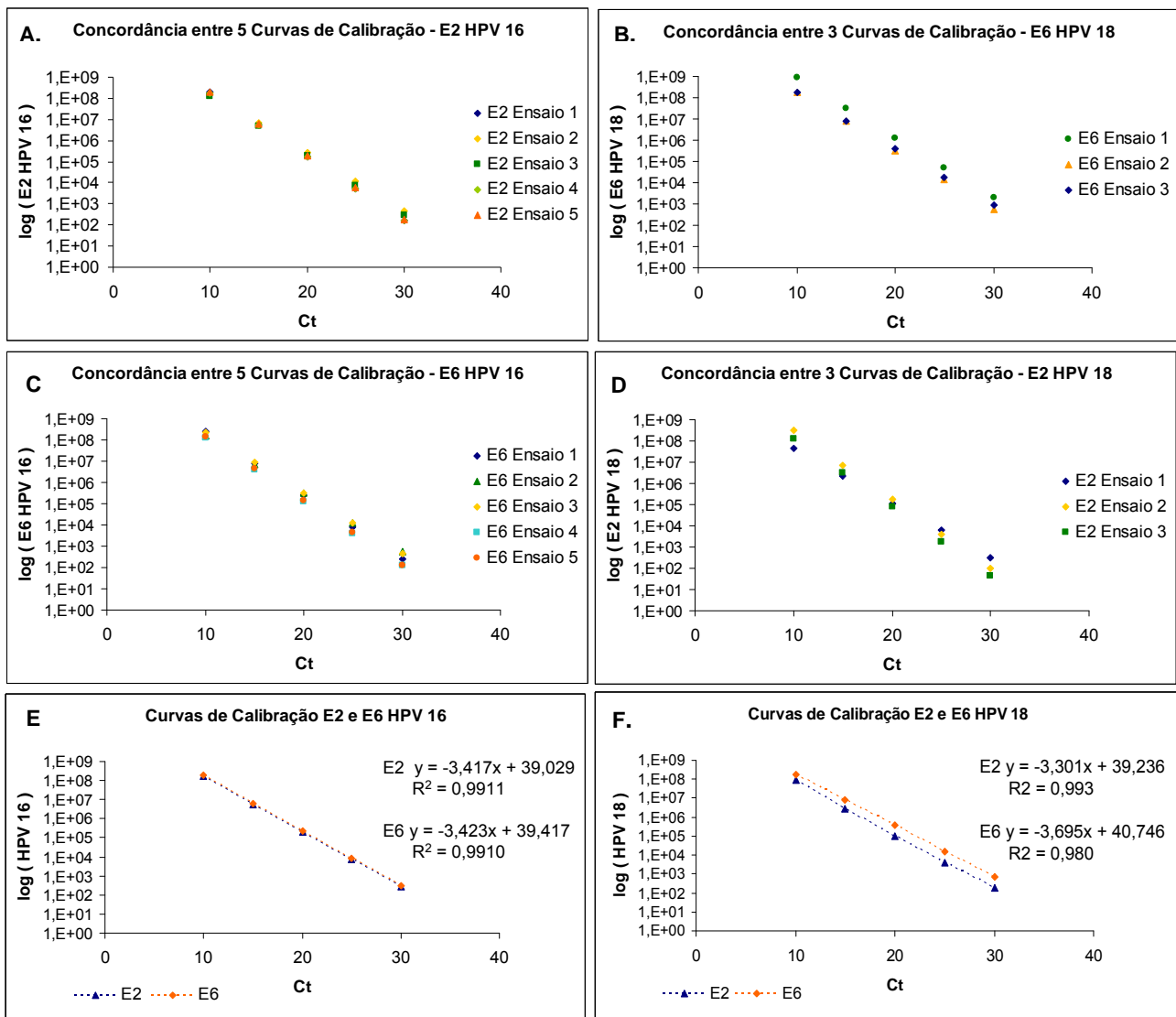


Figura 5: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação dos genes E2 e E6. Os Painéis A, B, C e D mostram a estreita correlação entre os pontos gerados para cada um dos amplicões, nas várias concentrações de calibradores, entre os vários ensaios. Os Painéis E e F mostram as curvas de calibração médias calculadas para E2 e E6 do HPV 16 e do HPV 18, respectivamente, usadas para a quantificação de ambos os genes, bem como as respectivas equações da recta.

A eficiência dos *primers* nos ensaios foi de 96,2% para E2 e 95,9% para E6 do HPV 16 e foi de 101,0% para E2 e 86,5% para E6 do HPV 18.

O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi de 1,28% (0,14-4,54) para o E2 e 0,82% (0,48-1,71) para o E6 do HPV 16 e de 1,38% (0,48-3,0) para o E2 e 0,80% (0,53-1,28) para o E6 do HPV 18. O CV inter-ensaio foi de 3,24% (2,67-4,26) para o E2 e 4,03% (3,39-4,78) para o E6 do HPV 16 e de 2,54% (0,21-4,30) para o E2 e 5,95% (4,24-7,56) para o E6 do HPV 18.

3.2 Avaliação da Correlação entre o Estado Físico do DNA do HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão

Para a avaliação do estado físico do DNA viral do HPV 16 foram estudadas 72 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 16, divididas em quatro grupos, de acordo com o diagnóstico citopatológico: normal (n=30), ASCUS (n=15), LSIL (n=18) e HSIL (n=9).

O DNA do HPV 16 foi considerado epissomal em 38,9% (28/72) dos casos e concomitante em 61,1% (44/72) estudados. Não foram identificados casos em que o DNA do HPV 16 se encontrasse exclusivamente sob a forma integrada (Figura 5 A).

Para a avaliação do estado físico do DNA viral do HPV 18 foram estudadas 41 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 18, divididas em quatro grupos, de acordo com o diagnóstico citopatológico: normal (n=10), ASCUS (n=16), LSIL (n=10) e HSIL (n=5).

O DNA do HPV 18 foi considerado epissomal em 11,6% (5/41) dos casos, concomitante em 69,8% (30/41) dos casos e integrado em 18,6% dos casos (8/41) estudados (Figura 5 B).

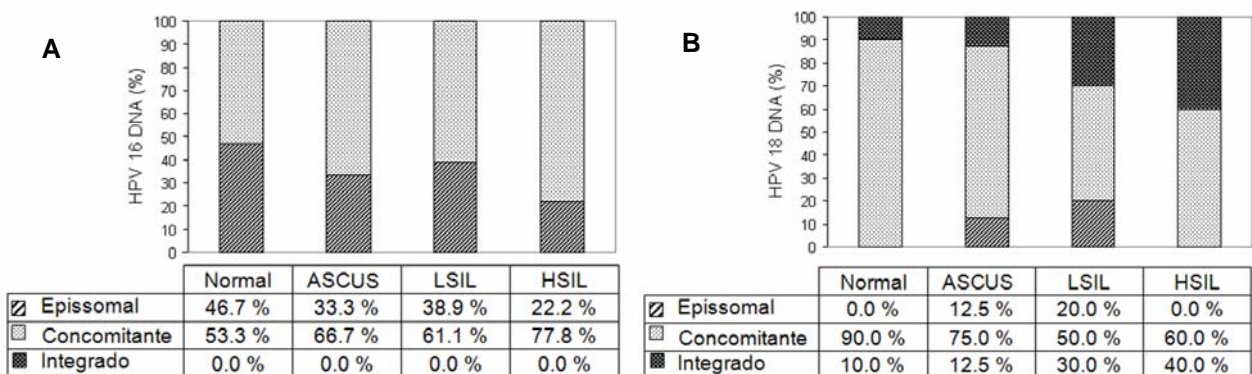


Figura 6: Distribuição de frequências do estado físico do DNA de HPV 16 e 18 Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau. As diferenças no estado físico do DNA relativamente ao diagnóstico citopatológico não são estatisticamente significativas, tanto para o HPV 16 (χ^2 para tabela 4x3, 2,010; $p=0,570$) como para o HPV 18 (χ^2 para tabela 4x3, 6,424; $p=0,377$).

A correlação entre o grau da lesão e o estado físico do DNA viral não é estatisticamente significativa, tanto para o HPV 16 como para o HPV 18. No entanto, os resultados obtidos permitem observar uma integração precoce do HPV 16 com manutenção de formas epissomais, tanto em citologias normais como nos vários graus de lesão. A presença de formas exclusivamente integradas em HPV 18 aumenta, segundo os resultados obtidos, em função do grau da lesão.

Nos casos em que o DNA viral se apresentou sob a forma concomitante a proporção de formas epissomais e integradas variou entre o HPV 16 e o HPV 18 (Figura 6). Na maioria dos casos de HPV 16 com o DNA sob a forma integrada, a razão E2/E6 foi superior a 0,5, ou seja a proporção de cópias epissomais foi duas vezes superior à das cópias integradas. Nos casos de HPV 18, por outro lado, a razão E2/E6 foi maioritariamente inferior a 0,5, ou seja a proporção de cópias epissomais foi duas vezes inferior à das cópias integradas.

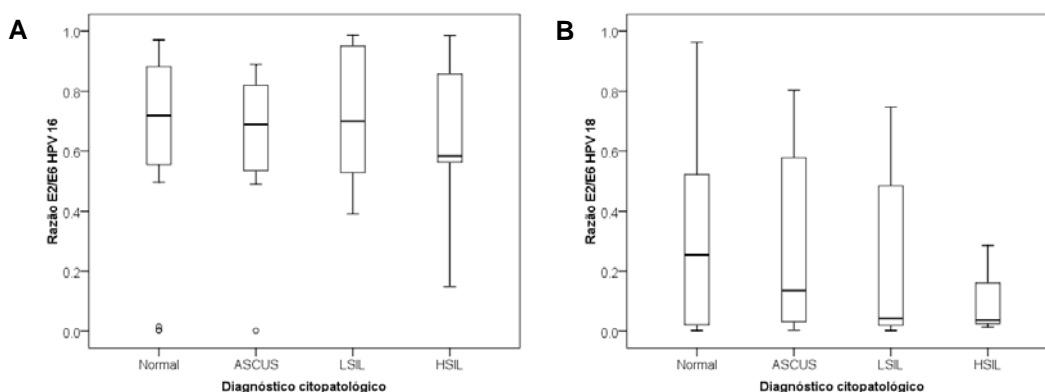


Figura 7: Distribuição dos valores da razão entre os genes E2 e E6 nos casos de HPV 16 (A) e 18 (B) com DNA concomitante.

Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau.

4. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A DETECÇÃO DO RNAm DOS ONCOGENES VIRAIS E6/E7 DOS HPV 16, 18, 31, 33 E 45 E A PROGRESSÃO DA LESÃO

Foram consideradas 247 mulheres com infecção simples e mistas por HPV 16,18, 31, 33 e 45 quanto à expressão do RNAm E6/E7 através do sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV. De acordo com o diagnóstico citopatológico e a informação clínica disponível, foram definidos cinco grupos de estudo: normal, ASCUS, LSIL, HSIL e CCU.

Tabela VIII - Distribuição da proporção do RNAm de E6/E7 obtida pelo sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV nas mulheres incluídas no estudo, de acordo com o diagnóstico citopatológico.

RNAm	Normal N=57	ASCUS n=40	LSIL n=65	HSIL n=73	CCU n=12	Total n=247
Negativo	25 (43,9)	15 (37,5)	27 (41,5)	16 (21,9)	0	83 (33,6)
Positivo	32 (56,1)	25 (62,5)	38 (58,5)	57 (78,1)	12 (100)	164 (66,4)
HPV 16	20 (62,5)	14 (56,0)	20 (52,6)	43 (75,1)	7 (58,3)	104 (42,1)
HPV 18	2 (6,3)	0	6 (15,8)	2 (3,5)	3 (25,0)	13 (5,3)
HPV 31	5 (15,6)	3 (12,0)	2 (5,3)	5 (8,8)	1 (8,3)	16 (6,5)
HPV 33	1 (3,1)	3 (12,0)	2 (5,3)	1 (1,83)	0	7 (2,8)
HPV 45	3 (9,4)	0	2 (5,3)	3 (5,3)	0	8 (3,2)
Mista	1 (3,1)	5 (20,0)	6 (15,8)	3 (5,3)	1 (8,3)	16 (6,5)

Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero. Os valores em percentagem são apresentados entre parêntesis.

A expressão dos oncogenes virais de pelo menos um destes HPV de alto risco foi identificada em 66,4% (164/247) dos casos, sendo que a percentagem de testes positivos aumentou em função da gravidade da lesão ($\alpha=0,01$; $p=0,000$).

A sobreexpressão do RNAm E6/E7 foi detectada mais frequentemente nas lesões HSIL (78,1%) e nos casos de carcinoma do colo do útero (100,0%) do que nos casos com citologia normal (56,1%) ou lesões LSIL (58,5%).

A sobreexpressão RNAm E6/E7 foi mais frequente nos casos de infecção por HPV 16 (63,7%; 109/196), seguida pelos casos de infecção por HPV 31 e pelos casos de expressão de oncogenes de dois ou mais destes HPV (ambos 9,4%). A sobreexpressão do RNAm E6/E7 do HPV 18, 45 e 33 foi de 7,6%, 5,3% e 4,7%, respectivamente.

5. QUANTIFICAÇÃO DO RNAm E7 DO HPV 16 E 18

5.1 Desenvolvimento e Implementação da Quantificação dos Transcritos de E7 do HPV 16 e 18 por PCR em Tempo Real

O método de PCR em tempo real aplicado foi desenvolvido após numerosas experiências de optimização para determinar a concentração ideal de *primers*, a concentração de standards, a quantidade de amostra e os parâmetros do termociclador a usar (Nolan *et al.*, 2006).

Numa primeira fase escolheu-se adoptar os *primers* descritos por Scheurer e colaboradores (2007) para a PCR em tempo real de quantificação do RNAm E7 do HPV 16 e do HPV 18. A PCR convencional permitiu obter os fragmentos desejados e a sequência nucleotídica, obtida por sequenciação, permitiu confirmar a correcta amplificação do amplicão. A PCR em tempo real com estes dois pares de *primers* revelou no entanto amplificações de fragmentos inespecíficos para além do fragmento desejado. Esta conclusão surgiu da ausência de um pico nítido na curva de desnaturação, realizada no fim do ensaio de PCR em tempo real, e da presença de uma banda adicional no resultado da electrorese em gel de agarose dos produtos do ensaio. Assim sendo, optou-se pelo desenho novos *primers* para amplificação das sequências a estudar.

Para a selecção dos *primers* para E7 do HPV 16 e do HPV 18, através do programa ABI Prism® Primer Express (Applied Biosystems), foram usados critérios como a sua dimensão (19-22 pb), o tamanho do amplicão (80-120 pb), a sua adequação às condições óptimas da mistura de reacção e do aparelho de amplificação e o método de detecção a usar (teor de GC e temperatura de desnaturação do fragmento), bem como a previsão da formação de dímeros de *primers*. Os novos *primers* desenhados revelaram-se específicos para o fragmento a quantificar, com um pico nítido na curva de desnaturação e uma banda única na electroforese em gel de agarose.

Inicialmente pretendeu-se também apresentar os resultados sob a forma de cópias de E7 por 50 ng de cDNA na reacção de PCR em tempo real, conforme descrito por Scheurer e colaboradores (2006). Para tal, procedeu-se à purificação das amostras após a transcrição reversa, quantificação por espectrofotometria dos produtos e aplicação de 50 ng na reacção de quantificação. Esta abordagem foi no entanto abandonada depois de se ter verificado que cerca de 80% do cDNA era perdido durante o processo de purificação e que a gama de resultados obtidos, aquando a quantificação por PCR em tempo real, era estreita e pouco discriminativa. Como alternativa, optou-se por quantificar por espectrofotometria o RNA, após o tratamento com *DNase I*, e adicionar 100 ng de RNA na reacção de transcrição reversa. A PCR em tempo real desenvolvido permitiu quantificar 1 a 2×10^5 cópias de E7 do HPV 16 e 1 a 4×10^4 cópias de E7 do HPV 18.

Depois de desenvolvido o protocolo definitivo, realizaram-se reacções paralelas nos diferentes passos do protocolo (tratamento dos ácidos nucleicos com *DNase I*, quantificação de RNA por espectrofotometria, transcrição reversa e PCR em tempo real) para assegurar a reprodutibilidade da técnica.

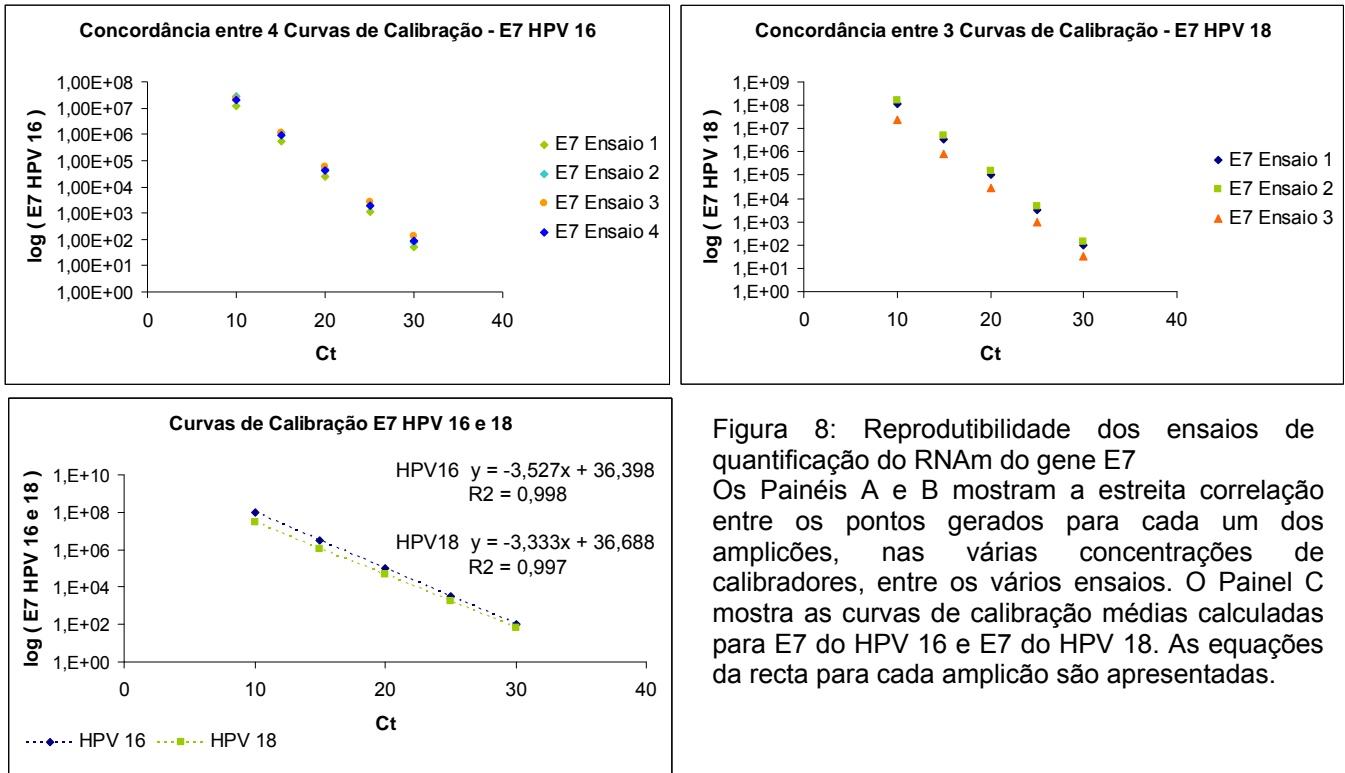


Figura 8: Reprodutibilidade dos ensaios de quantificação do RNAm do gene E7. Os Painéis A e B mostram a estreita correlação entre os pontos gerados para cada um dos amplicões, nas várias concentrações de calibradores, entre os vários ensaios. O Painel C mostra as curvas de calibração médias calculadas para E7 do HPV 16 e E7 do HPV 18. As equações da recta para cada amplicão são apresentadas.

A eficiência dos *primers* nos ensaios foi de 92,0% para o HPV 16 e de 99,5% para o HPV 18.

A concordância e linearidade entre os pontos de dados gerados para os amplicões de E7 nos diferentes ensaios é, regra geral, elevada, tanto para o HPV 16 como para o HPV 18 (Figura 6).

A linearidade dos valores revelou excelente reprodutibilidade da técnica. O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi de 0,90% (0,16-1,61) para o E7 do HPV 16 e 1,08% (0,11-1,78) para o E7 do HPV 18. O CV inter-ensaio foi de 4,88% (3,70-6,08) para o HPV 16 e 4,75% (3,60-7,17) para o HPV 18.

5.2 Avaliação da Correlação entre a Expressão de E7 de HPV 16 e 18 e a Progressão da Lesão

5.2.1 Quantificação do RNAm E7 do HPV 16

Para a quantificação do RNAm E7 do HPV 16 amostras foram estudadas 57 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 16. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal (n=13), ASCUS (n=9), LSIL (n=11), HSIL (n=19) e CCU (n=5).

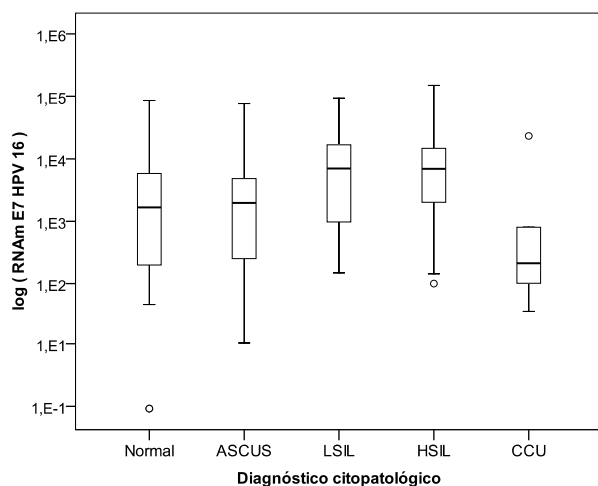


Figura 9: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 16 e o diagnóstico citopatológico.

Normal, Observação citológica normal; ASCUS, Alterações de significado indeterminado; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero; °, Provável outlier;

Os resultados obtidos revelam um aumento da expressão do RNAm de E7 de HPV 16 com o grau da lesão. No entanto, a expressão deste transcrito oncogénico apresenta, nos casos de carcinoma do colo do útero, regra geral, valores mais baixos que em qualquer outro grupo. Excluindo os casos de CCU, foi identificada uma correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de RNAm E7 e o diagnóstico citopatológico ($\alpha=0,05$; $\rho=0,046$).

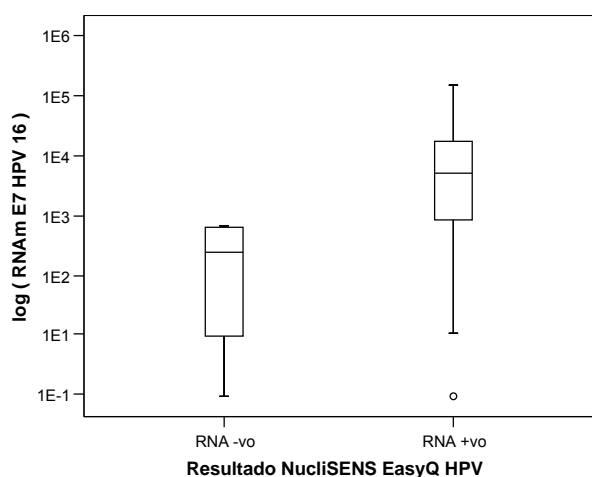


Figura 10: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 16 e o resultado do sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux).

RNA -vo, Testes com resultado negativo; RNA +vo, Testes com resultado positivo; °, Provável outlier;

Das 57 mulheres estudadas, 53 tinham resultado positivo para a detecção do RNAm E6/E7 do HPV 16 segundo o teste NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux) e quatro tinham resultado negativo (2 normal e 2 HSIL). Como base nos resultados para estes casos foi possível verificar correlação significativa entre o resultado do teste NucliSENS EasyQ HPV e a técnica de quantitativa desenvolvida ($\alpha=0,05$; $\rho=0,013$) (Figura 8).

5.2.2 Quantificação do RNAm E7 do HPV 18

Para a quantificação do RNAm E7 do HPV 18 foram estudadas 21 mulheres, com diagnóstico prévio de infecção por HPV 18. De acordo com o diagnóstico citopatológico, foram definidos cinco grupos: normal (n=3), LSIL (n=8) e HSIL (n=3) e CCU (n=3).

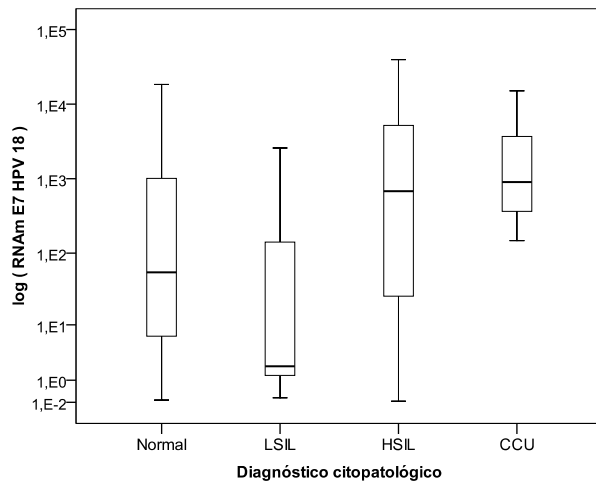


Figura 11: Relação a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 18 e o diagnóstico citopatológico. Normal, Observação citológica normal; LSIL, Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL, Lesão intraepitelial de alto grau; CCU, Carcinoma do colo do útero.

Embora os casos de HSIL e CC apresentem quantidades do RNAm E7 superiores às apresentadas pelos casos normais e de LSIL, não foi possível, dado o reduzido número de casos estudados, e sobre-representação dos casos de LSIL, realizar um tratamento estatístico dos resultados obtidos e concluir a respeito da associação entre a quantidade do RNAm E7 expressa e o grau da lesão (Figura 9). A grande dispersão nos valores apresentados para cada grupo de estudo é provavelmente um reflexo disso mesmo.

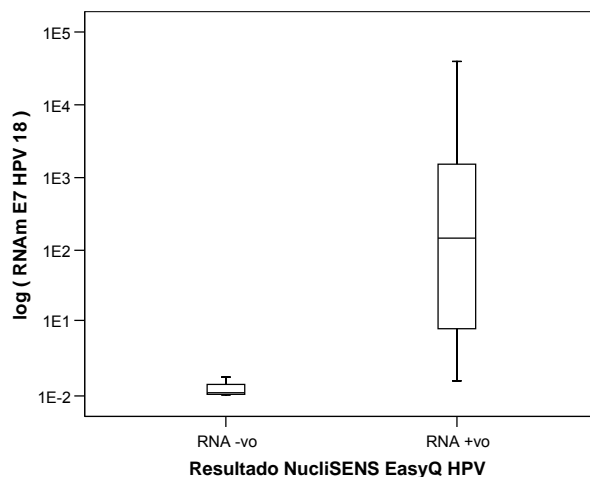


Figura 12: Relação entre a quantificação do RNAm do gene E7 do HPV 18 e o resultado do sistema comercial NucliSENS EasyQ HPV. RNA -vo, Testes com resultado negativo; RNA +vo, Testes com resultado positivo.

Das 21 mulheres estudadas, 17 tinham resultado positivo para a detecção do RNAm E6/E7 de HPV 18 segundo o teste NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux) e quatro tinham resultado negativo (1 normal, 1 ASCUS, 1 LSIL e 1 HSIL). A força da correlação entre o resultado do teste NucliSENS EasyQ HPV e a técnica de quantitativa desenvolvida foi mais forte para o HPV 18 ($\alpha=0,01$; $\rho=0,001$) do que para o HPV 16 (Figuras 8 e 10).

6. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA O ESTUDO DA METILAÇÃO DE REGIÕES ESPECÍFICAS DO HPV 16 E 18 POR MSP

Como explicado nos Materiais e Métodos o estudo da metilação do gene L1 do HPV 16 por MSP foi abandonado, perante a impossibilidade de desenhar *primers* adequados para esta sequência.

O estudo da metilação do gene L1 do HPV 18 foi realizado de acordo com o descrito por Turan e colaboradores (2007). Após realização de todos os passos necessários à obtenção de controlos com o fragmento completamente metilado ou completamente não metilado, procedeu-se à realização da MSP. No entanto, ao contrário do esperado, a MSP amplificou ambos os controlos gerados (o metilado e o não metilado) com ambos os pares de *primers*, para sequência metilada e para a sequência não metilada. Na tentativa de eliminar as amplificações inespecíficas procedeu-se à optimização da reacção de amplificação, sem nenhuma melhoria significativa no resultado final. Para identificar a causa da inespecificidade (a amostra ou os *primers*) foi realizado uma MSP dos produtos inespecíficos e, uma vez que os *primers* desta vez amplificaram o fragmento esperado, conclui-se que os controlos continham provavelmente formas metiladas e não metiladas em conjunto. Na presença de bandas inespecíficas foram realizadas novas MSP a partir do produto da primeira, com ambos os pares de *primers*. As condições da reacção foram mantidas. Quando a segunda amplificação foi específica, pôde concluir-se que a inespecificidade na amplificação se deveu à mistura de sequências de DNA na amostra e não à inespecificidade dos *primers* para a sequência alvo. Os produtos desta segunda MSP, uma vez que específicos, foram purificados e sequenciados. Os resultados da sequenciação revelaram que i) o controlo metilado artificialmente encontra-se efectivamente metilado nos CpGs como esperado; ii) o controlo não metilado encontra-se efectivamente não metilado; iii) a conversão CT foi largamente incompleta, sobretudo nos controlos metilados. Assim, embora a metilação seja eficaz e ambos os pares de *primers* exibam especificidade na amplificação do fragmento desejado, o resultado da conversão CT é uma mistura de sequências com diferentes padrões de conversão. Embora após a *nested*-MSP apenas se observe um fragmento amplificado, é importante compreender que a taxa de conversão na região de L1 situada entre os *primers* é altamente variável. A conversão e amplificação por *primers* metilados e não metilados das amostras, não foi prosseguida porque, embora algumas amostras tenham sido amplificadas apenas por um dos pares de *primers*, a conversão, não sendo completa, não permitiria assegurar a veracidade dos resultados. Foram introduzidas alterações ao protocolo comercial de conversão, por indicação do fabricante, sem melhorias significativas dos resultados.

A Figura 11 é apresentada como um exemplo dos resultados de sequenciação obtidos, onde se pode observar a conversão incompleta das sequências. Por fim, o protocolo foi abandonado, sugerindo-se a repetição do processo com utilização do protocolo de tratamento com bisulfito por métodos químicos *in house*, como descrito por Turan e colaboradores (2006).

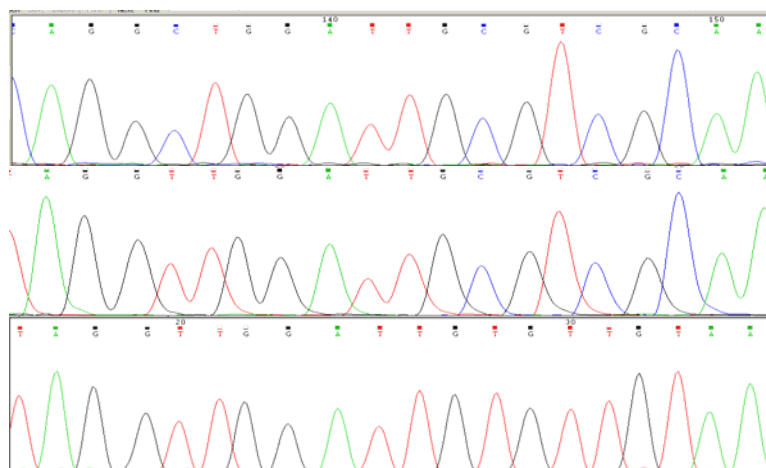


Figura 13: Representação gráfica de 3 resultados de sequenciação para a mesma região do gene L1 (NC_001357.1, 7027-7045), no local de ligação dos *primers* 18L1met-F e 18L1unmet-F. A Linha 1 é o resultado da sequenciação do controlo metilado pelo *primer* 18L1met-R. Embora o DNA se encontre convertido na região de ligação do *primer* 18L1met-R, o mesmo não se verifica para a restante sequência. O fragmento mostrado apresenta-se igual à sequência não tratada. A Linha 2 é o resultado da sequenciação de um produto equivalente ao da Linha 1, mas com uma maior taxa de conversão. Embora vários Cs não metilados tenham sido convertidos em Ts e os CpG metilados não tenham sido convertidos, a conversão foi incompleta, como revela a presença do nucleótido 7043 que, embora não metilado, permaneceu não convertido. A Linha 3 mostra o controlo não metilado, sequenciado pelo *primer* 18L1unmet-R, correctamente convertido.

7. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES METODOLOGIAS APLICADAS

Os resultados da carga viral, estado físico do DNA e expressão dos transcritos virais oncogénicos obtidos para um mesmo caso foram cruzados entre si com vista à investigação de associações entre os diferentes parâmetros.

Comprando os resultados da carga viral com o estado físico do DNA obtidos, a carga viral do HPV 16 aumenta dos casos em que o DNA se encontra sob a forma epissomal para os casos em que este se encontra sob a forma concomitante ($\alpha=0,05$; $\rho=0,011$). No entanto, não identificados casos em que o DNA do HPV 16 se encontrasse exclusivamente integrado, pelo que não é possível saber como a carga viral se comportaria nesses casos. Analisando a associação entre estes dois parâmetros por grau de lesão, a diferença na carga viral entre DNA epissomal e concomitante parece estar acentuada nas citologias normais, atípicas e nas lesões de baixo grau. No entanto, o reduzido número de casos em que o cruzamento de dados foi possível, não permite realizar um tratamento estatístico dos resultados.

Os resultados obtidos indicam que a carga viral do HPV 18 diminui dos casos em que o DNA se encontra sob a forma epissomal para a forma concomitante e para a forma integrada. No entanto, esta correlação não é estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$; $\rho=0,329$). Analisando a associação entre estes dois parâmetros por grau de lesão, a diferença na mediana da carga viral entre DNA epissomal, concomitante e integrado parece ser mais visível nas citologias atípicas e nas lesões de baixo grau. No entanto, não foram estudados casos de citologias normais com o DNA de HPV 18 epissomal ou integrado, pelo que não é possível inferir sobre esses resultados. Os casos de HSIL e

CCU analisados por ambas as técnicas foram demasiado poucos para permitir fazer suposições adicionais.

Comprando os resultados da carga viral com a expressão de transcritos oncogénicos virais obtidos para os mesmos casos, não foi possível identificar nenhum padrão predominante. Quanto à relação entre a carga viral e a expressão de E7 do HPV 18, por outro lado, foi possível verificar que um aumento da carga viral se correlaciona positivamente com o aumento da quantidade de RNAm E7 ($\alpha=0,05$; $\rho=0,032$).

Analisando a expressão de transcritos oncogénicos virais em função do estado físico do DNA viral, a expressão do E7 do HPV 16 é mais elevada nos casos em que o DNA se encontra integrado, seguida dos casos em que este se encontra sob a forma concomitante. Os casos de DNA sob a forma episomal apresentam os valores de RNAm E7 mais baixos. Ainda assim, esta tendência não apresenta significância estatística ($\alpha=0,01$; $\rho=0,116$). Não foi possível estabelecer qualquer associação entre a expressão de E7 e o estado físico do DNA do HPV 18.

DISCUSSÃO

Apesar de actualmente existirem vacinas profiláticas disponíveis para o HPV 16 e 18, é necessária uma maior compreensão do ciclo de vida e dos mecanismos subjacentes à oncogénese induzida por HPV para enfrentar os muitos desafios na área do HPV e cancro do colo do útero (Boulet *et al.*, 2007).

O trabalho desenvolvido teve como objectivo principal o desenvolvimento e implementação de metodologias que permitissem avaliar marcadores moleculares com valor preditivo relativamente à progressão da lesão. Adicionalmente, pretendeu-se também realizar o estudo de casos, com cada uma das metodologias desenvolvidas, para aplicar a técnica à investigação de casos clínicos e deste modo avaliar a técnica e estudar a associação de cada um deles com o resultado citopatológico disponível.

Uma das forças do trabalho desenvolvido reside na utilização dos mesmos produtos biológicos para o estudo dos casos clínicos pelas diferentes metodologias. Da mesma forma, sempre que possível, foi utilizado o mesmo DNA ou ácidos nucleicos totais para o estudo de casos pelas metodologias implementadas, que fora previamente analisado pelos os testes de diagnóstico comerciais.

Com vista à obtenção de resultados informativos relativamente ao comportamento de cada um dos marcadores moleculares estudados em função da gravidade da lesão foram seleccionados, tanto quanto possível, o mesmo número aproximado de casos por cada diagnóstico citopatológico. Devido ao reduzido número de casos disponíveis para determinados grupos (ex. casos de infecção por HPV 18, casos de carcinoma por HPV 16 ou por HPV 18), este propósito não foi sempre realizável.

Devido ao reduzido volume de DNA ou ácidos nucleicos obtido em cada extracção não foi possível estudar muitos casos por mais do que uma técnica. Assim o trabalho realizado apresenta algumas limitações, como seja, o número reduzido de amostras analisadas por cada método, o desequilíbrio no número de casos estudados relativamente a cada diagnóstico citopatológico, o número reduzido de amostras avaliadas relativamente a cada parâmetro estudado e o número reduzido de amostras estudadas pelo conjunto das abordagens.

O trabalho desenvolvido permitiu implementar metodologias de PCR em tempo real para a quantificação da carga viral e para o estudo do estado físico do DNA do HPV 16 e do HPV 18. O trabalho desenvolvido permitiu também desenvolver e implementar uma metodologia de transcrição reversa e PCR em tempo real para a quantificação do RNAm E7 do HPV 16 e do HPV 18. Todas as técnicas de PCR em tempo real implementadas apresentam eficiência satisfatória e reprodutibilidade elevada, tanto para os controlos como para as amostras. Acresce que, no caso da metodologia em tempo real para a quantificação do RNAm E7, foi possível validar a técnica por via da sua concordância com o teste de diagnóstico comercial NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux), tanto para o HPV 16 como para o HPV 18.

O estudo da metilação de CpGs específicos no gene L1 do HPV 16 e do HPV 18 por MSP não foi realizado por impossibilidade de construção de *primers* adequados para o HPV 16 e por conversão incompleta do DNA com tratamento com bisulfito no caso do HPV 18.

O estudo de casos relativamente à quantificação da carga viral do HPV 16 e do HPV 18 permitiu identificar uma correlação positiva entre a carga viral e o resultado citológico, como descrito noutros estudos (Carcopino *et al.*, 2006 ; Briolat *et al.*, 2007; Gravitt *et al.*, 2007; Saunier *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009, Keegan *et al.*, 2009). No caso do estudo do estado físico do DNA do HPV 16 e do HPV 18 não foi possível identificar associações estatisticamente significativas entre a integração do vírus no DNA da célula hospedeira e o diagnóstico citológico. No entanto foi possível verificar integração precoce no caso do HPV 16 e um aumento das formas de DNA exclusivamente integrado com o grau da lesão, como descrito por Huang e colaboradores (2008). Relativamente à detecção do RNAm E6/E7 pelo método comercial NucliSENS EasyQ HPV (BioMérieux), foi possível constatar que a percentagem de testes positivos para a expressão dos oncogenes virais dos HPV 16, 18, 31, 33 e 45 aumenta em função da gravidade da lesão, em concordância com os resultados obtidos por outros grupos (Molden *et al.*, 2006; Castle *et al.*, 2007; Keegan *et al.*, 2009).

Quanto à quantificação do RNAm E7 do HPV 16 por PCR em tempo real verificou-se um aumento da expressão do oncogene viral em função da gravidade da lesão, como descrito por de Scheurer e colaboradores (2005). No entanto, os casos de carcinoma estudados apresentaram valores de expressão inferiores aos de qualquer outro diagnóstico citológico, o que se pode dever à reduzida necessidade de expressão dos oncogenes virais num contexto de malignidade estabelecida. Para a quantificação do RNAm E7 do HPV 18 pela mesma metodologia não foi possível identificar nenhuma associação entre a expressão do transcrito e a gravidade da lesão, possivelmente devido ao pequeno número de casos estudados.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Deste modo propõem-se que em estudos futuros as metodologias desenvolvidas e implementadas no presente trabalho sejam utilizadas para estudar um maior número de casos, equitativamente distribuídos por lesão. Sugere-se igualmente que, para além de um número significativo de citologias normais, LSIL, HSIL e carcinomas, sejam estudados casos de ASCUS, com vista à identificação de valores de *cut-off* que permitam discriminar os casos de citologia normal e de ASCUS com maior ou menor probabilidade de vir a desenvolver HSIL. Deste modo seria possível evitar seguimento e tratamento desnecessário nos casos com reduzida probabilidade de progressão e focar os recursos nos casos de citologia normal e ASCUS cuja probabilidade de progressão fosse maior. Neste sentido seria também importante a realização de estudos longitudinais para avaliar a informação obtida por estes métodos num contexto temporal, de *clearance* ou progressão da lesão.

O estudo conjunto da carga viral, do estado físico do DNA viral e da quantificação do RNAm E7 num número significativo de casos de infecção por HPV 16 e/ou por HPV 18 permitiria obter uma imagem mais clara dos passos determinantes no desenvolvimento do cancro do colo do útero e suas lesões precursoras.

BIBLIOGRAFIA

- Andersson, S., Hansson, B., *et al.* (2006). Expression of E6/E7 mRNA from 'high-risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* 29: 705-11.
- Arias-Pulido, H., Peyton, C. L., *et al.* (2006). Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol* 44(5): 1755-62.
- Badal, V., Chuang, L. S., *et al.* (2003). CpG Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression. *J Virol* 77(11): 6227-34.
- Badal, S., Badal, V., *et al.* (2004). The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 324(2): 483-92.
- Badaracco, G., Venuti, A., *et al.* (2002). HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* 67(4): 574-82.
- Barbosa, M. S., Vass, W. C., *et al.* (1991). In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* 65(1): 292-8.
- Bhattacharjee, B. and Sengupta, S. (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 354(12): 280-5.
- Biedermann, K., Dandachi, N., *et al.* (2004). Comparison of real-time PCR signal-amplification in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol* 42: 3758-65.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
- Boulet, G., Horvath, C., *et al.* (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol* 39(11): 2006-11.
- Bosch, F.X., Lorincz, A., *et al.* (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 55: 244-65.
- Bosch, X., and Harper, D. (2006). Prevention strategies of cervical cancer in the HPV vaccine era. *Gynecol Oncol* 103: 21-4.
- Bosch, F.X., Burchell, A. N., *et al.* (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26(Suppl 10): K1-K16.
- Briolat, J., Dalstein, V., *et al.* (2007). HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer* 121(10): 2198-204.
- Broccolo, F., Chiari, S., *et al.* (2009). Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. *J Med Virol* 81(2) 278-87.
- Carcopino, X., Henry, M., *et al.* (2006). Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol* 78: 1131-40.
- Castellsague, X., Bosch, F. X., *et al.* (2002). Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 89(2): 191-9.
- Castle, P. E., Dockter, J., *et al.* (2007). A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res* 13(9): 2599-605.

- Castle, P. E. (2008). Invited commentary: is monitoring of human papillomavirus infection for viral persistence ready for use in cervical cancer screening? *Am J Epidemiol* 168(2): 138-44; discussion 145-8.
- Cattani, P., Siddu, A., *et al.* (2009). RNA (E6 and E7) assays versus DNA (E6 and E7) assays for risk evaluation for women infected with human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 47(7): 2136-41.
- Cheng, S., Schmidt-Grimminger, D. C., *et al.* (1995). Differentiation-dependant up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9: 2335-49.
- Cricca, M., Morselli-Labate, A. M., *et al.* (2007). Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 106(3): 549-57.
- Cuschieri, K. S., Whitley, M. J., *et al.*, 2004. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence—implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 73(1): 65-70.
- Cuzick, J., Mayrand, M. H., *et al.* (2006). Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/90-7.
- Dehn, D., Torkko, K.C., *et al.* (2007). Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer Cytopathol* 111(1): 1-14.
- de Boer, M. A., Jordanova, E. S., *et al.* (2007). High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 13(1): 132-8.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., *et al.* (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1): 17-27.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin.Sci.* 110: 525-41.
- Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., *et al.* (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 4: 38.
- Fehrman, L. A. (1993). The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis* 2: 74-86.
- Fehrman, F. and Laimins, L. (2003). A Human papillomaviruses: targeting of differentiating epithelia for malignant conversion. *Oncogene* 22:5201-5207.
- Fernandez, A. F., Rosales, C, *et al.* (2009). The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 19(3): 438-51.
- Frazer, I. H. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4(1): 46-54.
- Gravitt, P. E., Kovacic, M. B., *et al.* (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer* 121(12): 2787-93.
- Gravitt, P. E., Coutlee, F., *et al.* (2008). New technologies in cervical cancer screening. *Vaccine* 26 Suppl 10: K42-52.
- Guo, M., N. Sneige, *et al.* (2007). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* 20(2): 256-66.
- Herman, J. G., Graff, J.R., *et al.* (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-6.

- Ho, G.Y., Bierman,R., *et al.* (1998). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338: 423-8.
- Ho, C. M., Chien, T. Y., *et al.* (2006). Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 102(1): 54-60.
- Huang, L. W., Chao, S. L., *et al.* (2008). Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 61(5): 627-31.
- Huang, M. Z., Li, H. B., *et al.* (2009). Analysis of the dose-response relationship between high-risk human papillomavirus viral load and cervical lesions. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(8): 779-84.
- Hudelist, G., Manavi, M., *et al.* (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* 92(3): 873-80.
- Jones, P., Baylin, S. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell* 128(4): 683-92.
- Josefsson, A. M., Magnusson, P. K. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355(9222): 2189-93.
- Kalantari, M., Calleja-Macias, I. E., *et al.* (2004). Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 78(23): 12762-72.
- Kalantari, M., Villa, L. L., *et al.* (2008). Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Int J Cancer* 123(8): 1832-40.
- Keegan, H., Mc Inerney, J., *et al.* (2009). Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens. *J Virol Methods* 155(1): 61-6.
- Kim,K., Garner-Hamrick,P. A. *et al.* (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol* 77: 12450-9.
- Kim,Y. M, Park, J.Y., *et al.* (2008). Does pretreatment HPV viral load correlate with prognosis in patients with early stage cervical carcinoma? *J Gynecol Oncol* 19(2): 113-6.
- Kraus, I, Molden, T., *et al.* (2004). Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer.* 90(7): 1407-13.
- Kraus, I., Molden, T., *et al.* (2006). Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* 44(4): 1310-7.
- Kulmala, S. M., Syrjanen, S. M., *et al.* (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 59(5): 513-7.
- Lie, A. K., Risberg, B., *et a.* (2005). DNA- versus RNA-based methods for human papillomavirus detection in cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 97(3): 908-15.
- McLaughlin-Drubin, M. E., Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384: 335-344.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., *et al.* (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6(12): 924-35.
- Middleton, K., Peh, W., *et al.* (2003). Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol* 77(19): 10186-201.

- Moberg, M., Gustavsson, I., *et al.* (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer*. 92(5): 891-4.
- Molden, T. and Graus, I. (2005). Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2).
- Molden, T., Kraus, I., *et al.* (2006). Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol* 100(1): 95-100.
- Molden, T., Kraus, I., *et al.* (2007). PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 142(1-2): 204-12.
- Muñoz N., Castellsagué, X., *et al.* (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24S3 1-10.
- Muñoz, N.X., Hernandez-Suarez, G., *et al.* (2009). Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br J Cancer* 100: 1184-90.
- Nagao, S., Yoshinouchi, M., *et al.* (2002). Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40(3): 863-7.
- Nephew, K. P. (2009). What will it take to obtain DNA methylation markers for early cervical cancer detection? *Gynecol Oncol* 112(2): 291-2.
- Peitsaro, P., Johansson, B., *et al.* (2002). Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40(3): 886-91.
- Pett, M. and Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212(4): 356-67.
- Pirami, L., Giache, V., *et al.* (1997). Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 50(7): 600-4.
- Plummer, M., Schiffman, M., *et al.* (2007). A 2-year prospective study of HPV persistence among women with ASCUS or LSIL cytology. *J Infect Dis* 195: 1582-89.
- Quint, W. G. V., Pagliusi, S. R., *et al.* and the World Health Organization Human Papillomavirus DNA International Collaborative Study Group
44 (2): 571. (2006)
- Roberts, I., Ng, G., *et al.* (2008). Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. *BMC Biotechnol* 8: 57.
- Ruutu, M. P., S. M. Kulmala, *et al.* (2008). The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay. *Clin Biochem* 41(6): 423-8.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, *et al.* (2008). Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *Clin Microbiol* 46(11): 3678-85.
- Scheurer, M. E., Dillon, L. M., *et al.* (2007). Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infect Agent Cancer* 2: 8.
- Scheurer, M. E., Tortolero-Luna, G., *et al.* (2005). Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 E7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(8): 1948-52.

- Schiffman, M., Castle, P. E., *et al.* (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370: 890-907.
- Snijders, P. J. F., Hogewonig, C.J.A., *et al.* (2006). Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *Int J Cancer* 119: 1102-7.
- Sotlar, K., Stubner, A., *et al.* (2004). Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 74(1): 107-16.
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24(Suppl 1): S16-22.
- Steenbergen, R. D., de Wilde, J., *et al.* (2005). HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32(Suppl 1): S25-33.
- Strickler, H. D., Burk, R. D., *et al.* (2005). Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst* 97: 577-86.
- Tamura K., Dudley J., *et al.* (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tonon, S. A., Picconi, M. A., *et al.* (2001) Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesion. *J Clin Virol* 21(2): 129-34.
- Turan, T., Kalantari, M., *et al.* (2006). Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology* 349(1): 175-83.
- Turan, T., Kalantari, M., *et al.* (2007). High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology* 361(1): 185-93.
- van Tine, B. A., Dao, L. D., *et al.* (2004). Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(12): 4030-5.
- von Knebel-Doeberitz, M., and Syrjänen, K. J., (2006). Molecular markers: how to apply in practice. *Gynecol Oncol* 113(1): 18-20.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S., *et al.* (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64(11): 3878-84.
- Wentzensen, N., Sherman, M. E., *et al.* (2009). Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol* 112(2): 293-9.
- Woodman, C. B., Collins, S. I., *et al.* (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1): 11-22.
- Ylitalo, N., Sorensen, P., *et al.* (2000). Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355(9222): 2194-8.
- Zheng, Z. M. and Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11: 2286-302.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92(9): 690-8.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-50.