NARA DINIZ SOARES PESSOA

**Estudos sobre a expressão do Papilomavirus Humano
(HPV): avaliação comparativa sobre lesões cervicais,
sangue periférico e retinoblastomas**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo
2014

NARA DINIZ SOARES PESSOA

**Estudos sobre a expressão do Papilomavirus Humano
(HPV): avaliação comparativa sobre lesões cervicais,
sangue periférico e retinoblastomas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Stocco

Co-orientadora: Dra. Maria Tereza
Cartaxo Muniz

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pessoa, Nara Diniz Soares.

Estudos sobre a expressão do Papilomavírus humano (HPV):
avaliação comparativa sobre lesões cervicais, sangue periférico e
retinoblastomas / Nara Diniz Soares Pessoa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Papilomavírus humano (HPV).

Versão do título para o inglês: Studies on the expression of Human
papillomavirus (HPV): comparative assessment in cervical lesions,
peripheral blood and retinoblastomas.

1. *Papovaviridae* 2. Oncologia 3. Oncoproteínas
4. Imunohistoquímica 5. Hibridização 6. Danos do DNA I. Stocco,
Profa. Dra. Rita de Cassia II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB016/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Nara Diniz Soares Pessoa.

Título da Tese: Estudos sobre a expressão do Papilomavírus humano (HPV):
avaliação comparativa sobre lesões cervicais, sangue
periférico e retinoblastomas.

Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE**

Reunião: 27.04.2011

Protocolo CEP HUOC/PROCAPE:nº 021/2011

CAAE: 0015.0.106.000-11

Projeto: Estudos sobre a Expressão do Papilomavirus Humano (HPV): Avaliação comparativa sobre Lesões Cervicais, Sangue Periférico e Retinoblastomas.

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Projeto: APROVADO, conforme resolução 196/96.

Recife, 13.05.2011

Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Jr.

À Edméa Diniz Soares. *In memoriam.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me proporcionar força para enfrentar situações difíceis e momentos de satisfação que me impulsionaram ao longo dessa jornada.

Agradeço a minha filha, Laís, por tudo de bom que ela me traz e por ser, decididamente, a minha melhor parte. Tudo o que consegui até hoje foi por ela e para ela. Pela compreensão em todos os momentos de distância ocasionados pelo Doutorado fora de nossa cidade, obrigada, Laisinha. Amo!

Aos meus pais Lupércio e Suzana, minhas irmãs Bárbara e Elaina e meus cunhados Helder e Rafael, que me incentivaram, deram todo o apoio para a realização e finalização desta e de outras etapas pelas quais já passei. Aos meus pais, em especial, muito obrigada pelo amor e carinho...e por acreditarem em mim todos os dias dessa longa caminhada. Amo muito vocês!

A Mário, meu namorado e meu grande amigo, não tenho como agradecer o apoio incondicional que tem me dado...todos os dias, em todos os momentos. Uma pessoa com um coração enorme que tive o privilégio de conhecer, amar e caminhar ao seu lado. Seu incentivo nesta etapa do doutorado foi imprescindível para a finalização deste trabalho. Obrigada, meu amor.

Gostaria de agradecer a oportunidade dada pela minha orientadora Dra. Rita de Cassia Stocco e a minha co-orientadora Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz. Todo ensinamento e paciência me foram essenciais nesta fase da minha vida. Obrigada.

À Carolina Sabino pela imensa ajuda em todos os momentos desta jornada.

Ao Dr. Willy Beçak pelo suporte prestado à execução deste trabalho.

Aos pacientes participantes deste trabalho, mulheres, crianças e seus responsáveis, muito obrigada pela disponibilidade em concederem amostras para a realização da pesquisa.

Ao CISAM, por disponibilizar o local para as coletas.

Aos médicos do CISAM, Dra. Maria Luiza e Dr. Estefan Welkovic, agradeço por possibilitarem a execução das coletas das amostras de suas pacientes.

Aos funcionários do CISAM, técnicas e enfermeiras, pelo auxílio no momento das coletas.

A Dra. Virgínia, por disponibilizar o material de enucleação em cirurgias feitas e coordenadas por ela.

Ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz, por conceder gentilmente o bloco de parafina.

À empresa Inopat, representada por Cris, Juliano e Izabella, por toda a assistência técnica de extrema importância para o fechamento deste trabalho. Obrigada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Obrigada à coordenação da Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pelos recursos disponibilizados para a concretização do meu doutorado.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Citogenética do CEONHPE, em Recife (Carminha, Felipe Ferreira, Rosinha, Silvinha, Maíra, Thiago, Nelsione, Helker, Lidiane, Elker Lene, Marina, Jemima e Eros) pela ajuda e bom convívio no decorrer da execução deste trabalho.

Em especial, agradeço a algumas pessoas do meu grupo do laboratório em Recife, cujas presenças em minha vida pessoal e profissional fizeram muita diferença: à Adriana Vieira pela amizade sincera, paciência, apoio em todas as horas e ajuda nas mais diversas situações nesses anos de doutorado. Muito obrigada pela oportunidade de aprender com você a ter discernimento para tomar as melhores decisões tanto na minha profissão, quanto em situações na minha vida pessoal. Obrigada!; à Thalita Sant'Ana por nunca negar ajuda tantas vezes que precisei e pela amizade sempre presente.

À Helena Rocha pela amizade e ensinamento profissional.

À Joelma, pela ajuda nos cortes dos blocos de parafina.

Aos integrantes do Laboratório de Genética do Instituto Butantan (Rodrigo Franco, Dra. Suely, Jacqueline Mazzuchelli, Carla, Dilce, Diana, André, Lisley, Panda e Paulo), obrigada pela receptividade e ajuda quando precisei.

Agradeço a Adriana Neves pela ajuda no netendimento da patologia.

Em especial, agradeço a pessoas muito queridas do meu grupo em São Paulo, pessoas que, sem elas, este trabalho não seria concluído com êxito, Thati e Rodrigo Araldi:

A minha grande amiga Thati. Pude compartilhar com ela tudo o que o mestrado e, agora, o doutorado puderam fornecer: momentos de estresse, mas também momentos maravilhosos e ímpares que vou guardar pelo resto da minha vida. Pessoa extraordinária e extremamente capaz de fazer seu trabalho com a mais pura integridade e perseverança, como também de ajudar qualquer pessoa em qualquer situação. Um verdadeiro exemplo de ética profissional e, acima de tudo, de amizade. Obrigada!;

Ao Rodrigo Araldi pela imensa ajuda no fechamento do meu trabalho. Muito da minha tese devo a ele e aos seus ensinamentos. Obrigada!

Agradeço também à Pri Mayrink, pela amizade ao longo desses anos...muitos deles distantes uma da outra, com uma ponte aérea Recife- São Paulo no meio, mas construímos uma amizade de base forte e estável que ultrapassa qualquer dificuldade imposta pela distância física.

Ao meu amigo Marcinho, muito obrigada pela amizade e suporte nesta etapa final do trabalho.

À Bia, pela sua receptividade sempre.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

PESSOA, N. D. S. **Estudos sobre a expressão do Papilomavírus Humano (HPV):** avaliação comparativa sobre lesões cervicais, sangue periférico e retinoblastomas. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O Papilomavírus Humano (HPV) tem sido bastante estudado devido ao seu potencial carcinogênico relacionado à integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro. Já foram identificados mais de 120 tipos diferentes de HPV com base na heterogeneidade de seus genomas. De acordo com as frequências de diagnóstico viral associadas a casos de carcinoma, estes vírus foram classificados em baixo, intermediário ou de alto risco. Dentre os tipos de alto risco, também denominados oncogênicos, o mais freqüente é o HPV-16, responsável por cerca de 60 a 70% dos casos de carcinoma de cérvix associados a vírus. Além do câncer cervical, o HPV tem sido relacionado a diversos tipos de câncer, inclusive o retinoblastoma. Este trabalho visa estudar a atividade do HPV por diferentes abordagens, como o perfil clastogênico e análise de expressão de proteínas virais em amostras de mulheres e crianças atendidas na cidade do Recife, Pernambuco, avaliando esta atividade por técnicas de imunoistoquímica e ensaio cometa. O material escolhido foi constituído por amostras cervicais, sangue periférico e amostras do tumor de retina. Trinta e quatro mulheres e dez crianças foram avaliadas. A detecção viral foi realizada por PCR com iniciadores genéricos e específicos para os tipos HPV-16 e 18, descritos como os mais frequentes em amostras similares descritas na literatura. O HPV foi detectado em 29 mulheres (85,3%) e em 8 crianças com retinoblastoma, sendo o HPV-16 mais frequente que o HPV-18. Através da imunoistoquímica foi possível evidenciar a presença de proteínas virais E1+E4 (anticorpo anti- HPV-16), L1 (anticorpo anti-HPVs 1, 6, 11, 16, 18 e 31) e E6 (anticorpo anti- HPV-16 e HPV-18) em tecido parafinado em diversas regiões do olho, confirmando a atividade viral na amostra. Além disso, danos no material genético de mulheres com HPV foram evidenciados pelo ensaio cometa, sendo encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre linfócitos em cultura em pacientes positivas para HPV quando comparados àqueles de mulheres negativas para o vírus. Os dados trazem questionamentos sobre a presença de HPVs oncogênicos em tumores infantis e sua possível transmissão e mais evidências sobre os danos observados no DNA dos hospedeiros como consequência da presença e atividade virais.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. Ensaio cometa. Retinoblastoma. Imunoistoquímica. Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

PESSOA, N. D. S. **Studies on the expression of the human papillomavirus (HPV):** comparative assessment in cervical lesions, peripheral blood and retinoblastomas. 2014. 140 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The Human Papillomavirus (HPV) has been extensively studied due to its carcinogenic potential, related to the integration of viral DNA into the host genome. About 120 different types of HPV have already been described based on the heterogeneity of genome. According to the frequencies of viral diagnosis associated with carcinoma cases, these viruses were classified as low, intermediate or high risk. Among the high-risk types, also called oncogenic, the most common is HPV-16, accounting for about 60-70% cases of cervical cancer associated with viruses. In addition to carcinoma of the cervix, HPV has been linked to several cancers, including retinoblastoma. This work aims to verify the activity of HPV by different approaches, as the clastogenic action and viral protein expression analysis on samples of women and children from the city of Recife, Pernambuco, evaluating this activity by Immunohistochemistry techniques and Comet assay. The material for analysis was cervical samples, peripheral blood and retinoblastoma samples. Thirty-four women and 10 children were evaluated. Viral detection was performed by PCR with specific primers for the HPV types 16 and 18, described as the most frequent in similar reports. HPV was detected in 29 women (85.3%) and on 8 children with retinoblastoma, being HPV-16 the most frequent. By Immunohistochemistry was possible to evidence the presence of viral proteins E1^{E4} (antibody anti-HPV-16), L1 (anti-HPVs antibody 1, 6, 11, 16, 18 and 31) and E6 (antibody anti-HPV-16 and HPV-18) in waxed tissue in various segments of the eye, confirming the viral activity in the sample. In addition, damage to the genetic material of women with HPV has been showed by the Comet assay, showing a statistically significant difference between lymphocytes in culture in HPV positive patients when compared to those of negative women for the virus. The data are discussing the presence and expression of oncogenic HPV in retinoblastoma and the evidences of damage in the DNA of the host as a consequence of the presence and viral activity.

Keywords: Human papillomavirus. Comet assay. Retinoblastoma. Immunohistochemistry. *In situ* hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Relação de evolução entre os Papilomavírus humanos (HPVs).....	26
Figura 2. Genoma circular do Papilomavírus humano (HPV).....	27
Figura 3. Esquema da estrutura do capsídeo viral.....	30
Figura 4. Estágios do ciclo viral do papilomavírus em epitélio estratificado escamoso.....	32
Figura 5. Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV).....	34
Figura 6. Interação das oncoproteínas do Papilomavírus humano com proteínas supressoras de tumor do hospedeiro.....	35
Figura 7. Modelo da progressão do câncer cervical.....	40
Figura 8. Corte histológico de retinoblastoma, evidenciando as rosetas de <i>Flexner-Wintersteiner</i>	42
Figura 9. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene da β - actina.....	70
Figura 10. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR com os <i>iniciadores</i> MY e GP+ para o gene L1 de HPV..	70
Figura 11. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por <i>nested</i> -PCR com os <i>iniciadores</i> MY e GP+.....	71
Figura 12. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para HPV-16 (A) e HPV 18 (B) (região E6/E7).....	73
Figura 13. Núcleos e fragmentos do material genético corados com Iodeto de propídeo.....	75
Figura 14. Níveis de clastogenicidade na presença de HPV em sangue periférico e células cervicais.....	77
Figura 15. A e B: Níveis de clastogenicidade na presença de HPV em linfócitos periféricos.....	78
Figura 16. Comparação gráfica entre <i>scores</i> de cometas observados em amostras de cultura de linfócitos.....	81
Figura 17. Reta de regressão linear em amostras de cultivo de linfócitos HPV-positivas, demonstrando uma correlação positiva.....	82
Figura 18. Comparação gráfica entre <i>scores</i> de cometas observados em amostras de cultura de linfócitos.....	84

Figura 19. Reta de regressão linear em amostras de cultivo de linfócitos HPV-negativas, demonstrando uma correlação positiva.....	83
Figura 20. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene da β - actina.....	85
Figura 21. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene L1 de HPV com os iniciadores GP5+/GP6+.....	86
Figura 22. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para HPV-16 em amostras de sangue periférico e tumor de retina.....	87
Figura 23. Tecido ocular corado através da técnica de HE.....	88
Figura 24. Corte histológico de retinoblastoma, evidenciando as rosetas de <i>Flexner-Wintersteiner</i> formadas pelo arranjo de células tumorais.....	89
Figura 25. Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- L1 (HPVs 1, 6, 11, 16, 18 e 31).....	90
Figura 26. Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo monoclonal para as proteínas fusionadas E1 [^] E4 anti HPV-16.....	91
Figura 27. Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- E1 [^] E4 (HPV-16).....	92
Figura 28. Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- E6 (HPV-16 e 18).....	93
Figura 29. Hibridização <i>in situ</i> para HPVs em retinoblastoma.....	95
Figura 30. Hibridização <i>in situ</i> para HPVs em retinoblastoma, utilizando-se o cromógeno Green.....	96
Figura 31. Comparativo entre hibridização <i>in situ</i> e imunomarcção para HPVs em retinoblastoma, utilizando-se os cromógenos Green e DAB.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados na análise da qualidade do DNA e na detecção do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.....	59
Tabela 2. Iniciadores utilizados na análise da qualidade do DNA e na detecção do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.....	60
Tabela 3. Dados demográficos, características comportamentais e clínicas das mulheres.....	69
Tabela 4. Resultados de detecção do HPV, geral e específica, nas amostras biológicas das mulheres (n=34).....	73
Tabela 5. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas, comportamentais e clínicas e a detecção viral com iniciadores genéricos em mulheres atendidas no CISAM/UPE no período de 2012 a 2013.....	74
Tabela 6. Ensaio Cometa em diferentes amostras biológicas provenientes das pacientes atendidas no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros- CISAM.....	76
Tabela 7. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk nas amostras de cultivo de linfócitos e material cervical de mulheres HPV-positivas e negativas....	79
Tabela 8. Scores dos Cometas observados em 8 pacientes HPV positivas e 3 HPV negativas , seguidos dos valores estatísticos do teste de Mann- Whitney (U, Z(U) e p) em macrocultura de linfócitos em intervalos de 0h, 24h e 48h e material cervical obtido por esfoliação.....	80
Tabela 9. Dados demográficos, características comportamentais e clínicas das crianças com retinoblastoma (n=20).....	84
Tabela 10. Resultados de detecção do HPV, geral e específica, nas amostras biológicas das crianças (n=2).....	87
Tabela 11. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas e clínicas e detecção viral em crianças com retinoblastoma..	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Funções das proteínas do Papilomavírus humano (HPV).....	30
Quadro 2. Correlação entre a terminologia de displasia <i>in situ</i> e os vários graus de NIC, assim como aquela do Sistema Bethesda.....	39
Quadro 3. Sistemas de classificação Reese-Ellsworth e CCG-962 para retinoblastoma.	43
Quadro 4. Anticorpos primários e secundários utilizados na imunohistoquímica com suas respectivas diluições.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC	Substrato cromógeno - 3-amino 9-etilcarbazol = +substrate.
BPV	Papilomavirus Bovino
Cyt	Células cervicais
DAB	Substrato cromógeno - diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Proteínas virais classificadas como precoces (E- <i>Early</i>)
E2F	Proteína se liga e inativa fatores de transcrição
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
HE	Hematoxilina e Eosina
HPV	O Papilomavírus Humano (HPV)
HSIL	lesão intra-epitelial de alto grau
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (International Committee on the Taxonomy of Viruses)
IDH	maior Índice de Desenvolvimento Humano
IHQ	<i>Imunoistoquímica</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	Proteínas virais classificadas como tardias (L – <i>Late</i>),
LCR	Região longa de controle (<i>Long Control Region</i>)
LMA	Agarose temperatura de fusão baixa (<i>Low Melting Point</i>)
LSIL	lesão intra-epitelial de baixo grau
MHC	Complexo de Histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
ml	Mililitro
µm	Micrômetro
NIC	Neoplasias Intra Epiteliais Cervicais
NMA	Agarose temperatura de fusão alta (<i>Normal Melting Point</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Quadros abertos de leituras (<i>Open reading frames</i>)

P53	Proteína supressora tumoral
pb	Pares de base
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)</i>
PV	Papilomavírus
RB	Retinoblastoma
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro (RNA Mensageiro)
SCGE	Eletroforese em gel de célula única (<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>)
SIL	Lesão intra-epitelial escamosa
SP	Sangue periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS-T	Solução de Tris-base + Tween
URR	Região de regulação <i>Upstream (Upstream Regulation Region)</i> ,
VLPs	Partículas semelhantes aos vírus (<i>virus-like particles</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Papilomavírus (PVs) - considerações gerais.....	24
2.2 Papilomavírus Humano (HPV).....	25
2.3 Organização genômica e tipos de HPV.....	27
2.4 Transcrição dos genes virais.....	28
2.5 Proteínas do HPV	29
2.6 Processo de infecção.....	31
2.7 Proteínas do HPV no processo carcinogênico	33
2.8 Cofatores e HPV	36
2.9 Doenças associadas ao HPV.....	37
2.9.1 Câncer cervical.....	38
2.9.1.1 <i>Câncer cervical e HPV.....</i>	<i>39</i>
2.9.2 Retinoblastoma.....	41
2.9.2.1 <i>Retinoblastoma e HPV.....</i>	<i>44</i>
2.10 Técnicas para detecção do HPV e suas proteínas.....	44
2.10.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e HPV.....	44
2.10.2 Imunoistoquímica (IHQ).....	46
2.11 Atividade clastogênica do HPV.....	46
2.11.1 A técnica de Ensaio Cometa.....	47
2.12 Produção de vacinas contra HPV.....	48
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo Geral.....	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Localização do estudo e período.....	54
4.2 Grupos e seleção de pacientes.....	54
4.3 Caracterização das amostras.....	55
4.4 Coleta de material biológico.....	55
4.4.1 Coleta de sangue periférico.....	55
4.4.2 Coleta de células cervicais.....	56

4.4.3 Obtenção dos tumores de retina.....	56
4.5 Cultura de linfócitos.....	56
4.6 Extração e quantificação do DNA.....	57
4.7 Avaliação da qualidade do DNA extraído	57
4.8 Detecção viral por PCR convencional com os iniciadores genéricos MY e GP+.....	58
4.9 Tipificação viral.....	59
4.10 Confecção de lâminas histológicas para as técnicas de Imunoistoquímica e Hibridização in situ.....	60
4.11 Desparafinização dos cortes histológicos de retinoblastoma.....	60
4.12 Lâminas com HE.....	61
4.13 Imunoistoquímica.....	61
4.14 Hibridização in situ.....	63
4.15 Ensaio Cometa.....	64
4.16 Análises estatísticas.....	65
4.17 Considerações éticas.....	66
5 RESULTADOS.....	67
5.1 Grupo 1 (mulheres).....	68
5.1.1 Perfil das pacientes: dados demográficos, comportamentais e clínicos.....	68
5.1.2 Detecção e Tipagem viral.....	69
5.1.2.1 <i>Avaliação da qualidade do DNA extraído.....</i>	<i>69</i>
5.1.2.2 <i>Detecção geral do HPV com os iniciadores genéricos pela técnica de PCR.....</i>	<i>70</i>
5.1.2.2.1 <u><i>Detecção do HPV pela técnica de nested-PCR</i></u>	<i>71</i>
5.1.2.3 <i>Detecção do HPV com iniciadores específicos pela técnica de PCR.....</i>	<i>71</i>
5.1.3 Detecção e tipagem viral X dados sociodemográficos.....	74
5.1.4 Ensaio cometa.....	75
5.2 Grupo 2 (crianças).....	84

5.2.1 Perfil dos pacientes: dados demográficos e clínicos das crianças.....	84
5.2.2 Detecção e tipagem viral.....	85
5.2.2.1 Avaliação da qualidade do DNA extraído.....	85
5.2.2.2 Detecção do HPV com os iniciadores genéricos pela técnica de PCR.....	85
5.2.2.3 Detecção específica do HPV em crianças do segmento prospectivo do Grupo 2.....	86
5.2.3 Imunoistoquímica.....	88
5.2.4 Hibridização <i>in situ</i>	94
6 DISCUSSÃO	99
7 CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS	114
APÊNDICES	134
APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- HPV e câncer cervical.....	135
APÊNDICE B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- HPV e retinoblastoma.....	137
APÊNDICE C- Ficha anamnética.....	139

1 INTRODUÇÃO

Um dos grupos de vírus mais relevantes pelos efeitos patológicos causados/associados é composto pelo papilomavírus (PV). O fato do papilomavírus humano (HPV) assumir papel de agente que predispõe à perda de estabilidade e integridade genômica é a razão pela qual tem sido associado a vários tipos de câncer.

O HPV é o vírus mais prevalente envolvido nas doenças sexualmente transmissíveis no mundo e um importante desafio da saúde pública. O DNA de HPV tem sido detectado em mais de 90% de todos os casos de câncer cervical e infecções, com os tipos de alto risco HPV-16 e HPV-18 ligados a mais de 50% de todos os casos deste tipo de câncer. Trata-se da segunda doença maligna mais comum entre as mulheres e responsável por 1/5 das mortalidades associadas a tumores entre pacientes diagnosticadas a cada ano. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados para o ano de 2014, 15.590 novos casos de câncer de colo do útero no Brasil, sendo 5.370 na região Nordeste. A mortalidade ocasionada por este tipo de tumor pode chegar a 5.160 pacientes no país.

Além do câncer cervical, o HPV já foi detectado em outros tipos de cânceres como o retinoblastoma (RB). As evidências epidemiológicas demonstradas na literatura que relatam associação entre o HPV e o RB, assim como a necessidade de um modelo epidemiológico-molecular plausível, levam a propor um estudo que viria a contribuir para o esclarecimento da relação etiopatogênica entre o vírus e a patologia. A obtenção de tais evidências é uma questão de importância epidemiológica e de potencial impacto nas estratégias públicas de prevenção do câncer.

A literatura sugere que a origem da infecção por HPV de crianças com retinoblastomas pode ser materna. Portanto, a diminuição da incidência do vírus nas mulheres pode acarretar uma diminuição desses casos de câncer ligados à infecção viral. Qualquer esforço que venha a diminuir casos de infecções, lesões e/ou cânceres cervicais, é de extrema importância na diminuição de casos de retinoblastomas esporádicos que envolvam o HPV.

Além dos cânceres já citados, o HPV já foi detectado em amostras de tumores de pênis, de pulmão, de cabeça e pescoço, entre outros. Este fato demonstra a urgência de um maior entendimento da biologia deste vírus. Pesquisas que forneçam dados promissores para estas questões e, conseqüentemente, para

avanços terapêuticos, incorporam conhecimentos sobre a relação da infecção viral com o câncer à literatura pré-existente.

Portanto, o presente trabalho teve como foco entender o mecanismo de ação do papilomavírus humano em amostras de mulheres e de crianças, empregando diferentes técnicas e adotando diferentes abordagens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus (PVs) - considerações gerais

Baseando-se em uma série de critérios de similaridade, como o capsídeo não envelopado e o genoma constituído de DNA circular dupla-fita, os Papilomavírus (PVs) foram originalmente agrupados na família *Papovaviridae* junto aos Poliomavírus. No entanto, a identificação de tamanhos genômicos diferentes entre esses dois grupos, as divergências em suas organizações genômicas e a inexistência de maiores similaridades nas seqüências de aminoácidos, levaram à reorganização dos PVs pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV-International Committee on the Taxonomy of Viruses) em duas famílias separadas: *Polyomaviridae*, compreendendo os Poliomavírus, e *Papillomaviridae*, família dos Papilomavírus que inclui 16 gêneros diferentes (DE VILLIERS et al., 2004; MAYO, 2005).

Os PVs constituem um grupo de vírus que infecta várias espécies de vertebrados. Genomas de PVs tem sido isolados e bem caracterizados de répteis (HERBST et al., 2009), aves (TERAI et al., 2002), marsupiais (BENNETT et al., 2010) e de diversos mamíferos, inclusive humanos, podendo causar neoplasias ou persistir de forma assintomática (BERNARD et al., 2010).

De modo geral, tais vírus são considerados estritamente espécie-específicos, não infectando nenhum outro hospedeiro que não seja o seu natural. Porém, casos de infecção cruzada por PVs na natureza foram identificados em cavalos e outros eqüídeos, infectados pelos papilomavírus bovinos dos tipos 1 e 2 (NASIR; CAMPO, 2008).

As infecções por Papilomavírus induzem lesões geralmente benignas que podem regridir sem causar problemas clínicos mais avançados. Porém, as lesões podem persistir, gerando uma malignidade, o que acontece na presença de cofatores, ambientais e genéticos (BOCCARDO et al., 2010; CAMPO, 2003; MUNHÖZ et al., 2006; SCHIFFMAN et al., 2007). Como exemplo, a ingestão da samambaia *Pteridium aquilinum* por bovinos infectados pelo Papilomavírus Bovino (BPV) pode desencadear tumores na bexiga urinária e no trato gastrointestinal superior (CAMPO, 2006). Já em humanos, o Papilomavírus humano (HPV) tem sido considerado um fator de risco essencial, embora não suficiente, para o desenvolvimento de cânceres, como o de colo uterino (CARESTIATO et al., 2006; WALBOOMERS et al., 1999).

2.2 Papilomavírus Humano (HPV)

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado o vírus mais prevalente envolvido nas doenças sexualmente transmissíveis no mundo e, portanto, um importante desafio da saúde pública. Mais de 130 tipos de HPV tem sido sequenciados e incluídos em gêneros (Figura 1) (DOOBAR et al., 2012). Esta classificação está de acordo com sua associação a patologias.

A patologia maligna mais estudada em relação à infecção com o HPV é o câncer cervical, apesar do vírus já ter sido relacionado a diversos outros tipos de câncer (BOSCOLO-RIZZO et al., 2013; CARPAGNANO et al., 2011; MOHAN et al., 2009; SIGAROODI et al., 2012). O DNA do vírus tem sido detectado em mais de 99% de todos os casos de câncer do colo do útero, sendo considerado a principal causa da maioria das Neoplasias Intra Epiteliais Cervicais (NIC) (ZUR HAUSEN, 1999). Este tumor é o segundo tipo mais comum de câncer entre as mulheres no mundo e responsável por 1/5 das mortalidades associadas a câncer entre pacientes diagnosticadas a cada ano (PIRSANI; BRAY; PARKIN, 2002).

Em sua maioria, as alterações cervicais induzidas por HPV são passageiras, com 90% delas regredindo espontaneamente entre 12 a 36 meses. Fatores como predisposição genética, frequência de re-infecção, tipo viral, coinfeção, níveis hormonais e resposta imune podem influenciar a capacidade do organismo de eliminar uma infecção pelo vírus (SCHLECHT et al., 2001). Por outro lado, em alguns casos, as proliferações papilomatosas induzidas por alguns tipos de HPV específicos podem vir a se tornar lesões malignas (tumores malignos) (DE VILLIERS et al., 2004). Esta progressão está frequentemente associada a diversos cofatores ambientais (CAMPO, 2006).

Figura 1. Relação de evolução entre os Papilomavírus humanos (HPVs). A imagem demonstra uma árvore filogenética de máxima verossimilhança para os genes E1, E2, L2 e L1 de 132 HPVs. Os Papilomavírus humanos compreendem 5 grupos evolucionários com diferentes tropismos epiteliais e associações com doenças. Os Alfa-papilomavírus incluem tipos de baixo-risco mucosotrópicos, que causam verrugas genitais (destacados em laranja), e tipos de alto-risco mucosotrópicos causadores de neoplasias cervicais e câncer (destacados em rosa). Modificado de Doobar et al. (2012)

Em relação à incidência do HPV na população, muitos estudos objetivam entender a prevalência do HPV em determinadas áreas, não só em casos de cânceres cervicais, mas também em outros tipos de câncer. Muñoz et al. (2003) indicaram o HPV-16 como o mais frequente em todos os países estudados, seguido do HPV-18 e -45.

Por outro lado, na América Latina, os tipos virais mais frequentes foram HPV-31 e -35. Porém, estudos realizados no Brasil indicaram o HPV-16 como o vírus mais prevalente em todas as regiões, existindo uma variação em relação aos demais tipos, sendo HPV-18 o segundo mais prevalente nas regiões Norte, Sudeste e Sul e os tipos 31 e 33 mais frequentes no Nordeste e Centro-Oeste depois do tipo 16 (BALDEZ DA SILVA et al., 2009; BRITO et al., 2002; PEREIRA et al., 2007; RABELO-SANTOS et al., 2003).

2.3 Organização genômica e tipos de HPV

Segundo Gottschling et al. (2007), o genoma dos PVs é constituído por uma única molécula circular de DNA dupla-fita (Figura 2) e compreende, aproximadamente, 8.000 pares de bases (pb). O genoma viral está contido dentro de um capsídeo esférico composto por 72 capsômeros e a informação genética está distribuída entre oito sequências codificantes para proteínas classificadas como precoces (E – *Early*) e tardias (L – *Late*), de acordo com suas expressões temporais. Além das regiões codificantes, existe no genoma viral, a região reguladora LCR (*Long Control Region*), um segmento de 850pb, também conhecida como URR (*Upstream Regulation Region*), que não contém ORFs (*Open reading frame*- quadro aberto de leitura), mas regula os processos de replicação e transcrição viral (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

Figura 2. Genoma circular do Papilomavírus humano (HPV). URR: Região de controle (*Upstream Regulation Region*); E1, E2, E4, E5, E6 e E7: genes precoces; L1 e L2: genes tardios. (Fonte: <http://www.genpathdiagnostics.com>).

Convencionalmente os papilomavírus isolados são descritos por “tipos”. Algumas centenas de novos tipos foram identificadas a partir da técnica de PCR, com o uso de iniciadores degenerados e seqüenciamento de ácidos nucleicos (DE VILLIERS et al., 2004).

Os genótipos dos PVs são classificados por análises de parte do genoma viral, compreendendo as seqüências nucleotídicas combinadas das ORFs E6, E7 e L1 (CHAN et al., 1995). A ORF L1 é a mais conservada do genoma e, por este motivo, tem sido utilizada para identificação de novos tipos de papilomavírus (DE VILLIERS et al., 2004). Diferenças acima de 10% entre duas seqüências de DNA da ORF de L1 definem um novo tipo de PV. Diferenças entre 2% e 10% identificam um novo subtipo viral, enquanto a definição de uma nova variante se dá com menos de 2% de divergência entre as seqüências de L1 (DE VILLIERS et al., 2004).

Já foram identificados mais de 120 tipos diferentes de Papilomavírus Humano, com base na heterogeneidade do genoma. De acordo com as freqüências de diagnóstico viral associadas a casos de carcinoma, esses vírus foram classificados em baixo, intermediário ou de alto risco. Dentre os tipos de alto risco, também denominados oncogênicos, o mais freqüente é o HPV-16, responsável por cerca de 60 a 70% dos casos de carcinoma de cérvix associados a vírus. Outros tipos de HPV também classificados como oncogênicos são: 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82 (WAGGONER, 2003). Já os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108 são considerados de baixo risco (MUNÕZ et al., 2003). Os tipos virais de baixo risco são vírus cujas proteínas codificadas pelos genes E6 e E7 possuem baixo potencial para a indução da transformação celular, causando normalmente lesões benignas. Neste grupo, os tipos mais frequentes são os HPV-6 e -11 (LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

2.4 Transcrição dos genes virais

A Longa Região de Controle do genoma viral não codifica proteínas mas contém a origem de replicação bem como múltiplos sítios de ligação de fatores de transcrição. Estes fatores são importantes na regulação da transcrição iniciada pela RNA polimerase II de genes precoces bem como promotores tardios (BERNARD, 2002). Apesar do termo gene não ser equivalente a uma ORF, em geral, cada ORF no genoma do papilomavírus, é frequentemente referida para um gene. Uma ORF codifica um peptídeo através de combinações de diferentes éxons através de *splicing* dos íntrons (ZHENG; BAKER, 2006).

No genoma de HPV-16, dois promotores são bem conhecidos. O promotor P97 encontra-se *upstream* da ORF de E6 e é responsável por quase toda a expressão

gênica precoce (SMOTKIN; WETTSTEIN, 1986). O segundo promotor, P670, está localizado dentro da ORF E7 e é responsável pela transcrição de genes tardios (GRASSMANN et al., 1996). Por se localizar dentro de uma ORF precoce, o RNAm tardio é um transcrito quimérico de regiões precoces e tardias, que pode ser processado com a clivagem dessas regiões precoces. Os transcritos da região tardia são detectados apenas em queratinócitos diferenciados (BARKSDALE; BAKER, 1993).

Quase todos os transcritos dos papilomavírus são policistrônicos com múltiplos exons e íntrons que sofrem extensivo processamento alternativo de RNA. Este processo alternativo desempenha um importante papel na determinação de quais “ORFs” serão traduzidas destes transcritos multicistrônicos. Sendo assim, os papilomavírus codificam muitas proteínas em um genoma compacto e, por possuírem processamento alternativo, expressam diferencialmente estas proteínas em uma célula de diferenciação específica e de forma temporal (ZHENG; BAKER, 2006). Devido a sua alta complexidade, ainda são necessários mais estudos dos transcritos de mRNAs de forma a analisar quais transcritos são utilizados para a tradução de proteínas durante o processo de infecção.

2.5 Proteínas do HPV

O capsídeo é formado pelo arranjo das proteínas estruturais L1 e L2 (Figura 3). A proteína L1 tem, entre outras, a função de mediar a ligação viral na superfície celular. A proteína L2 programa a encapsidação do genoma viral, induzindo a organização do vírion pela sua ligação ao DNA viral (FAY et al., 2004; STAUFFER et al., 1998). Ambas as proteínas têm sido utilizadas na produção de vacinas na medida em que são imunogênicas e podem se auto-organizar em “VLPs” (“virus-like particles”- partículas semelhantes aos vírus) (HAGENSEE et al., 1993).

Figura 3. Esquema da estrutura do capsídeo viral, demonstrando as proteínas virais L1 e L2. Adaptado de Liu et al. (1997).

As proteínas E1 e E2 estão envolvidas na replicação do DNA viral e regulação da transcrição precoce. (BAKER; HOWLEY, 1987), ativando ou reprimindo promotores virais (HAM et al., 1991). Já as proteínas E5, E6 e E7 possuem propriedades oncogênicas que induzem a imortalização e transformação celular (ZHENG; BAKER, 2006).

A proteína E4 interage com o citoesqueleto da célula hospedeira, tendo, portanto, função na liberação de novos vírions (BOULET et al., 2007). As funções das proteínas virais estão resumidas no Quadro 1.

Quadro 1. Funções das proteínas do Papilomavírus humano (HPV). Fonte: Boulet et al. (2007)

Proteína	Função
E1	Função de helicase; essencial para replicação viral e controle da transcrição.
E2	Papel na replicação e na repressão da replicação; regula transcrição e replicação viral; cotrola a região de expressão precoce.
E4	Interage com proteínas do citoesqueleto, por isso tem envolvimento na liberação de novos vírions das células do hospedeiro.
E5	Envolvida na transformação celular.
E6	Envolvida na transformação celular; se liga e degrada a p53, possuindo um efeito antipoptótico celular; induz a instabilidade genômica; ativa a telomerase.
E7	Envolvida na transformação celular; se liga e inativa a pRb, liberando o fator de transcrição E2F; induz a instabilidade genômica.
L1	Compõe o capsídeo viral; tem papel na infecção (ligação viral à superfície celular).
L2	Compõe o capsídeo viral; papel na infecção e organização do DNA viral.

2.6 Processo de infecção

No modelo de infecção viral em células epiteliais, o ciclo de replicação do papilomavírus está amplamente ligado aos processos de diferenciação destas células (CAMPO, 2003). Inicialmente, a infecção ocorre com o acesso das partículas infecciosas à camada basal do epitélio, o que só é possível pelo rompimento por microabrasões do epitélio estratificado, expondo a camada basal ao ambiente (DOOBAR, 2005).

A jornada da partícula viral da superfície celular para o citoplasma e núcleo consiste em diversos passos que o aproximam do seu local de replicação. O capsídeo viral, portanto, desempenha um papel chave no processo de infecção (PELKMAN; HELENIUS, 2013). A entrada do vírus na célula hospedeira se inicia com a ligação de L1 a receptores conservados da superfície celular (RODEN et al., 1994; SAPP; DAY, 2009). Os glicosaminoglicanos de heparan sulfato são receptores primários de superfície celular que medeiam a interação com Papilomavírus, bem como com diversos outros vírus, bactérias e protozoários (SHAFTI-KERAMATI et al., 2003).

Por endocitose, o vírus consegue ser internalizado, um processo que para o HPV ocorre lentamente (XU et al., 2006). Várias vias endocíticas tem sido descritas e aquelas mediadas pela clatrina e caveolina são relatadas com as principais vias utilizadas por vírus para infectar células. Estas duas vias tem sido evidenciadas em estudos de internalização do HPV, embora a via dependente de clatrina tenha sido mais descrita para este processo (DAY; LOWY; SCHILLER, 2003). Após a sua introdução nos queratinócitos, o vírus começa a utilizar a maquinaria celular para se replicar a partir da divisão celular e diferenciação do epitélio (CAMPO, 2006).

A expressão das proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) da região precoce do genoma viral é encontrada nas camadas não diferenciadas e intermediária de diferenciação dos queratinócitos, enquanto a expressão das proteínas estruturais L1 e L2 da região tardia do genoma é realizada nas camadas de diferenciação terminal. Apesar da ORF E4 estar localizada na região E do genoma do papilomavírus, ela continua sendo expressa nos queratinócitos da camada mais diferenciada e está associada ao colapso dos filamentos de queratina (HOWLEY; LOWY, 2001; ZHENG; BAKER, 2006).

O padrão da expressão dos genes virais é dependente da expressão das proteínas virais E1 e E2 que permitem a manutenção do DNA viral na forma episomal (WILSON et al., 2002) e facilitam a correta segregação dos genomas durante a divisão celular (YOU et al., 2004). O genoma do papilomavírus é mantido como um elemento extracromossômico nos núcleos (FRAZER, 2004), mas não necessariamente permanece como episomo, podendo se integrar ao genoma do hospedeiro (ARIAS-PULIDO et al., 2006).

Parte das proteínas regulatórias é expressa na camada basal e suprabasal (E6 e E7) e estimula a progressão do ciclo celular associando-se com proteínas regulatórias do ciclo (MUNGER et al., 2001b), ocorrendo, de forma concomitante, a replicação do genoma na camada granular e escamosa. A ação oncogênica viral envolve a produção de oncoproteínas na célula hospedeira que interferem com as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, resultando em anomalias genéticas (CAMPO, 2006). A expressão das proteínas estruturais (L1 e L2) e a formação do capsídeo ocorrem na camada escamosa e, a partir daí, novas partículas virais infectantes ou vírions são liberados no processo de descamação desta camada (Figura 4).

Figura 4. Estágios do ciclo viral do papilomavírus em epitélio estratificado escamoso. Adaptado de Doobar et al. (2012).

A regressão das lesões depende de gravidade da doença. Fatores como predisposição genética, frequência de reinfecção, variantes de um mesmo tipo viral, co-infecção com mais de um tipo viral, níveis hormonais e resposta imune podem

influenciar nesse processo da capacidade do organismo em eliminar uma infecção por HPV (Schlecht et al., 2001).

2.7 Proteínas do HPV no processo carcinogênico

A expressão da proteína E2 tem como consequência a diminuição da expressão das oncoproteínas E6 e E7, ligadas ao processo carcinogênico. A atividade transcricional de ambos oncogenes, E6 e E7, está sob controle de um promotor comum, p97, o qual é reprimido principalmente pelo produto do gene viral E2 (ROMANCZUK et al., 1990). Em baixo nível, E2 atua como um ativador transcricional, enquanto em níveis elevados, reprime a expressão oncogênica (DOOBAR, 2006).

Uma característica dos HPVs de alto risco associada à carcinogênese é a freqüente integração do genoma viral no cromossomo dos hospedeiros, resultando na ruptura do gene E2 e na perda de sua expressão. Conseqüentemente, ocorre a manutenção dos altos níveis de expressão E6/E7 (BAKER; HOWLEY, 1987). Portanto, a transcrição oncogênica (altos níveis de E6/E7) é ausente ou muito baixa tanto em lesões pré-malignas, como no epitélio normal infectado por HPV, nos quais os papilomavírus predominantes se encontram na forma episomal (não integrada) (JOHNSON et al., 1990). Estas observações sugerem que, apesar de E2 não ter papel transformante, seu mecanismo de ação é um importante passo durante o processo carcinogênico associado ao HPV (LAGUNAS-MARTÍNEZ et al., 2009).

Em muitos casos, tumores cervicais positivos para HPV-16 contém tanto episomos virais quanto genoma viral integrado. Isto sugere que o HPV possui múltiplas vias para induzir a tumorigênese. Uma via é através de altos níveis de expressão de E6 e E7 ocasionada pela integração viral no genoma do hospedeiro. Já a segunda via pode ocorrer em células que ainda mantêm o episomo viral, nas quais a expressão de E1 e E2 promove a instabilidade genômica através da replicação anormal de sequências de HPV integradas (BAGARELLI; OLIANI, 2004; KRISTIANSEN; JUNKINS; HOLM, 1994).

Estudos demonstram que durante a carcinogênese cervical, a expressão das ORFs E6 e E7 de HPV é necessária para transformação e imortalização celular (MÜNGER et al., 1989a; SOTLAR et al., 1998; ZUR HAUSEN, 1988). Em lesões cervicais causadas por HPV, o aumento da proliferação das células epiteliais

suprabasais é atribuído à expressão destas oncoproteínas (Figura 5). Conseqüentemente, a expressão persistente desses oncogenes poderia servir como indicador para a progressão de NIC a câncer invasivo (SOTLAR et al., 1998).

Figura 5. Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Displasia é caracterizada pela expansão de células da camada basal dentro da camada suprabasal e atividade mitótica nessas camadas. Múltiplas mitoses podem ocorrer como consequência da expressão de oncoproteínas virais e contribuir para a instabilidade genômica. A progressão maligna é frequentemente associada à integração viral ao genoma do hospedeiro. Isto leva a um aumento da expressão das oncoproteínas E6/E7 e perda da expressão de E5. Adaptado de Helliner e Münger (2011).

A proteína E6 age conjuntamente com a proteína E7 para induzir as modificações que levam à imortalização da célula (KIYONO et al., 1998), porém, a proteína E7, em alguns casos, pode sozinha induzir a imortalização (HALBERT et al., 1991). A superexpressão dos oncogenes virais E6 e E7 nas células do epitélio basal é um importante passo para o processo de transformação oncogênica, levando a um descontrole na ativação do ciclo celular, inibição da apoptose e, finalmente, à instabilidade cromossômica com a integração viral (WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2007).

A oncoproteína viral E6 degrada e inativa a proteína p53 via proteólise mediada pela ubiquitina. A p53 é uma proteína supressora de tumor que sinaliza resposta às ações de agente citotóxicos e genotóxicos. Adicionalmente, a p53 também é ativada após um estímulo inadequado de síntese de DNA, o que pode ser induzido pela

infecção por HPV (MESPLÈDE et al., 2012). Um polipeptídeo celular da célula hospedeira, o polipeptídeo associado à E6 (E6-AP), se liga inicialmente à proteína E6 e este complexo E6/E6-AP atua como uma ubiquitina-ligase, conjugando ubiquitina à p53 (Figura 6A), levando à degradação da p53. Este mecanismo *in vivo* pode ser especialmente importante nas fases incipientes da progressão tumoral (MANSUR, 2001; WERNESS et al., 1990)

Já a proteína E7 de HPV leva a inativação de outra proteína, a pRb, não permitindo a ligação desta com o fator de transcrição E2F. A E7 liga-se à forma não-fosforilada da pRb, liberando o fator de transcrição E2F, anteriormente ligado à pRb (Figura 6B). Ocorre, então, a transcrição dos genes necessários à síntese de DNA. Desta forma, a proteína E7 perturba o crescimento celular normal, estimulando a expressão de genes responsáveis pela divisão celular (MANSUR, 2001).

Figura 6. Interação das oncoproteínas do Papilomavírus humano com proteínas supressoras de tumor do hospedeiro. A) Mecanismo de degradação e inativação da p53 decorrente da ação da oncoproteína E6 de HPV. B) Mecanismo de inativação da pRb decorrente da ação da oncoproteína E7 de HPV. Fonte: <http://www.cancer-therapy.org>

Tanto a p53 quanto a pRb são supressores de tumor celular bem conhecidos, envolvidos em processos como a progressão do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, diferenciação e senescência (BUIRAGO-PÉREZ et al., 2009).

Apesar de E6 e E7 dos tipos de alto risco induzirem à transformação celular, a oncoproteína E5 pode acentuar suas funções e contribuir com a progressão do tumor (BOUVARD et al., 1994). Como o gene E5 apresenta altos níveis de expressão em neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e baixos níveis em

carcinomas cervicais invasivos, é possível que sua função seja particularmente importante nos estágios iniciais da carcinogênese (Figura 5).

Células cervicais tetraplóides são frequentemente encontradas em lesões pre-cancerígenas (OLAHARSKI et al., 2006). Estudos demonstram que, para ocorrer a fusão, na presença de HPV, a proteína E5 deve ser expressada em ambas as células (HU; CERESA, 2009). A proteína E5 possui todas as características de uma proteína fusogênica, incluindo sua localização na membrana plasmática e alto nível de hidrofobicidade (ZERFASS et al., 1995). Porém, é considerado que a E5 possui uma fraca propriedade oncogênica que ocorre através do aumento do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR- *epidermal growth factor receptor*) e inibição da expressão do Complexo de Histocompatibilidade (MHC- *major histocompatibility complex*)-I e MHC-II na membrana plasmática, comprometendo o *clearance* tumoral (TAI; CHEN, 2003).

2.8 Cofatores e HPV

A presença de HPV não é suficiente para a transformação maligna, sendo uma série de outros fatores importantes para o surgimento do processo carcinogênico (CAMPO, 1998).

Dentre os cofatores, já foram identificados em associação com HPV o início precoce da atividade sexual, uso prolongado de contraceptivos orais, multiparidade, múltiplos parceiros, outras doenças sexualmente transmissíveis, exposição à fumaça de cigarro e consumo de álcool, entre outros (CASTELLSAGUÉ et al., 2002; MEYER et al., 2008; MOKTAR et al., 2009; PINTO et al., 2002; PIYATHILAKE et al., 2004; PIYATHILAKE et al., 2007; VELEMA et al., 2002)

Um fator de risco de extrema importância para o desenvolvimento de câncer cervical ligado ao HPV é o tabagismo. Estudos demonstram seu envolvimento na progressão da neoplasia cervical (CASTELLSAGUÉ; MUÑOZ, 2003), tendo as mulheres fumantes maior probabilidade de desenvolvimento de câncer cervical, assim como de cabeça e pescoço (ALAM et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2010; MICHL et al., 2010). Além disso, foi relatada uma maior prevalência de infecção por HPVs de alto risco entre mulheres fumantes, e esta associação parece depender do número de cigarros fumados por dia (VACCARELLA et al., 2008)

Autores demonstram uma redução do número de células de Langerhans e outros marcadores de resposta imune em indivíduos fumantes. Isto sugere que a exposição ao tabaco afeta a habilidade do hospedeiro responder de forma imune a infecções virais (POPPE et al., 1996). A genotoxicidade induzida pela fumaça do cigarro resulta na formação de micronúcleos, alterações nas cromátides, aberração cromossomal, quebras na fita de DNA, entre outros (DE MARINE, 2004), devido aos seus compostos carcinógenos (HECHT, 2003).

A inflamação causada por uso de tabaco e álcool pode aumentar a permeabilidade da superfície de mucosas para entrada de partículas virais (MEYER et al., 2008). Estudos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço portadores de HPV, determinam uma sinergia entre a infecção pelo vírus e alto consumo de álcool como fator de risco para este tipo de câncer (SMITH et al., 2004).

Cabe ainda salientar a ação de outro cofator relacionado à formação de cânceres na presença do HPV, como a ingestão da samambaia *Pteridium aquilinum*, que possui princípios clastogênicos, carcinogênicos e mutagênicos (WALTER-MOURA et al., 1988). Aberrações cromossômicas devido à ingestão da samambaia na presença do BPV têm sido descritas em bovinos (WALTER-MOURA et al., 1988). Stocco dos Santos et al. (1998) relataram pela primeira vez que danos cromossômicos podem ocorrer mesmo na ausência dos compostos carcinogênicos da samambaia. Quebras cromossômicas e cromatídicas, fragmentos acêntricos e rearranjos cromossômicos são exemplos de aberrações encontradas em células infectadas. Já com HPV, estudos em Ouro Preto - Minas Gerais com humanos consumidores crônicos de broto de samambaia têm sido conduzidos para averiguação desta planta como cofator no desenvolvimento de câncer, visto que se trata de uma planta constituinte da dieta regional (MIRANDA et al., 2012; RECOUSO et al., 2003).

2.9 Doenças associadas ao HPV

O HPV tem sido relacionado a lesões benignas e malignas na mucosa e epitélio. Dentre as malignas, destacam-se o câncer cervical, de cabeça e pescoço, pulmão, mama, retinoblastoma, entre outros (BOSCOLO-RIZZO et al., 2013; CARPAGNANO et al., 2011; MOHAN et al., 2009; SIGAROODI et al., 2012).

2.9.1 Câncer cervical

Uma estimativa de 528.000 novos casos de câncer cervical invasivo foram diagnosticados no mundo no ano de 2012, com 266.000 mortes decorrentes deste tipo de tumor, representando 7,5% de todas as mortes por cânceres em mulheres (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2013), são estimados para o ano de 2014, 15.590 novos casos de câncer de colo do útero, sendo 5.050 considerados para a Região Nordeste e 970 em Pernambuco. A mortalidade ocasionada por este tipo de tumor chegou a 5.160 pacientes em 2011.

Atualmente os esforços do Ministério da Saúde (MS) para combater o câncer de colo uterino têm se concentrado na prevenção secundária, com o uso do rastreamento através do exame Papanicolaou na população feminina sexualmente ativa. A recomendação seguida pelo MS desde 1988 é da Organização Mundial da Saúde (OMS), que propõe a realização do exame a cada três anos, para mulheres de 25 a 60 anos, ou antes desta faixa etária, caso já tenha iniciado a atividade sexual, após dois acompanhamentos anuais negativos (AN ADVISORY COMMITTEE, 2007). Apesar destes esforços, a permanência de altas taxas de incidência e mortalidade por câncer de colo uterino aponta para uma ainda insuficiente efetividade dos programas (DAWAR et al., 2007; GARLAND et al., 2007).

O diagnóstico morfológico para lesões no colo do útero é utilizado tanto em esfregaços celulares (citologia), quanto em cortes de tecido (histopatologia). A histopatologia é capaz de graduar as lesões de acordo com o seu potencial proliferativo (SOUZA et al., 2001). O termo neoplasia intraepitelial cervical (NIC) foi introduzido por Richart em 1968 para indicar uma ampla gama de atipia celular limitada ao epitélio. A NIC foi dividida em graus 1, 2 e 3 (RICHART, 1968). A classificação histopatológica inclui as lesões intra-epiteliais em três graus: NIC 1, NIC 2 e NIC 3 (TAVASSOLI; DEVILLE, 2003). A lesão NIC 1 apresenta maturação em dois terços do epitélio e as células contêm atipias variáveis que podem incluir o efeito citopático decorrente da infecção por HPV, a coilocitose. Anormalidades nucleares também estão presentes nestas lesões. Já em lesões NIC 2, a maturação está presente em metade do epitélio e a atipia nuclear se torna bem evidente.

Lesões NIC 3 a maturação pode estar ausente ou confinada ao terço superior do epitélio e as anormalidades nucleares estão presentes na maioria ou em toda a espessura do epitélio. Neste grau, as mitoses atípicas são eventos frequentes. (TAVASSOLI; DEVILLE, 2003).

Outra classificação utilizada principalmente em países da América do Norte é aquela do Sistema Bethesda, onde se faz uso do termo lesão intra-epitelial escamosa (SIL) e um esquema de dois graus que compreendem lesões de baixo grau (LSIL) e lesões de alto grau (HSIL). O termo lesão foi usado para enfatizar que qualquer das alterações morfológicas em que se baseia um diagnóstico não identifica necessariamente um processo neoplásico. A correlação entre a terminologia de displasia/in situ e os vários graus de NIC, assim como o aquela do Sistema Bethesda, são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Correlação entre a terminologia de displasia *in situ* e os vários graus de NIC, assim como aquela do Sistema Bethesda. (Disponível em IARC: <http://screening.iarc.fr>).

Displasia	Terminologia da NIC	Terminologia do Sistema Bethesda
Normal	Normal	Dentro dos limites de normalidade; Alterações celulares benignas (infecção ou reparação) ASCUS/AGUS
Atipia	NIC de baixo grau (NIC 1)	LSIL
Displasia leve ou discariose leve	NIC de baixo grau (NIC 1)	LSIL
Displasia moderada ou discariose moderada	NIC de alto grau (NIC 2)	HSIL
Displasia grave ou discariose grave	NIC de alto grau (NIC 3)	HSIL
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC de alto grau (NIC 3)	HSIL
Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo

NIC: neoplasia intraepitelial cervical; LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGUS: células granulares atípicas de significado indeterminado.

2.9.1.1 Câncer cervical e HPV

Os HPVs são agentes causadores de diversos estados patológicos, com aproximadamente 500 milhões de novos casos de verrugas genitais a cada ano (GREEN; GATSON, 2006). O vírus tem sido relacionado desde a formação de

verrugas até o câncer cervical. Aproximadamente 15 tipos de HPV de alto risco estão envolvidos com câncer de colo do útero, sendo os tipos 16 e 18 detectados em 50% das NIC 3 e em 70% dos cânceres cervicais invasivos (SMITH et al., 2007). A maioria das infecções por HPV na mucosa cervical são assintomáticas e, quando lesões se tornam clinicamente visíveis, frequentemente regredem dentro de 6 a 18 meses graças à resposta imune do hospedeiro (STANLEY, 2006,).

A reversão com eliminação da infecção pelo HPV pode ocorrer, assim como a regressão das lesões pré-cancerosas (Figura 7) (LOUVANTO et al., 2010; SCHIFFMAN, KJAER, 2003). Esta regressão está relacionada a mecanismos imunológicos humorais (BONTKES et al., 1999) e celulares (DE GRUIJIL et al., 1998). As imunoglobulinas IgG e IgA têm o papel de bloquear a entrada do vírus nas células epiteliais. Uma vez que a infecção tenha ocorrido, a imunidade mediada por células é essencial para eliminá-la (SANCLEMENTE; GILL, 2002).

Em alguns casos, as lesões persistem e podem progredir para a formação de câncer. Este fato está ligado à persistência da infecção de HPV de alto risco na cérvix (PLUMMER et al., 2007).

Um modelo funcional para o desenvolvimento do câncer de colo do útero tem sido proposto, incluindo os seguintes passos: infecção por HPV → persistência viral → transformação e desenvolvimento de lesões pré-cancerosas → câncer invasivo (KRAUS et al., 2004), demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Modelo da progressão do câncer cervical (WENTZENSEN; KLUG, 2008)

2.9.2 Retinoblastoma

Retinoblastoma (RB) é o tumor intraocular de maior incidência na infância, ocorrendo em 1 a cada 15.000-20.000 crianças (SACHDEVA; O'BRIEN, 2012). Na Europa, América do Norte e Austrália, o retinoblastoma corresponde a cerca de 2% a 4% de todos os tumores na infância. Já no Brasil, em relação a tumores pediátricos em 2012, estimam-se 11.530 novos casos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos (INCA, 2012). Dados do INCA (2008) sobre incidência do retinoblastoma na cidade de Recife indicaram 8 casos nesta capital no período entre 1997 a 2001, sendo uma maior incidência no sexo masculino (6 casos). Foi observado um decréscimo da mortalidade constante em ambos os sexos, podendo ser consequência da melhora do tratamento e sobrevida (RIBEIRO; ANTONELI, 2007).

O RB é um tumor de células neuroectodermas, podendo desta forma ser classificado como tumor neuroectodérmico primitivo (RAZEK; ELKHAMARY, 2011). Histologicamente, o RB é uma neoplasia composta por densa massa de células pequenas e redondas, com núcleo hipercromático e citoplasma escasso. Necrose é um achado constante, sendo característica a presença de células tumorais viáveis ao redor dos vasos (SCHWIMER; PRAYSON, 2001; SOUZA FILHO et al., 2005). Além disso, ocorre a formação de rosetas *Flexner-Wintersteiner* (Figura 8), que possuem um arranjo específico onde as células tumorais estão posicionadas de forma circular em torno de um lúmen (RAZEK; ELKHAMARY, 2011).

Os sinais e sintomas dependem do tamanho do tumor e da localização, sendo o mais comum, a leucocoria, denominada “reflexo do olho de gato”, geralmente descrita pelos pais das crianças. Outras manifestações são: estrabismo, heterocromia, inflamação de órbita, hifena, perda de visão e glaucoma secundário (ANTONELI, 1999).

Figura 8. Corte histológico de retinoblastoma, evidenciando as rosetas de *Flexner-Wintersteiner* (setas) (Disponível em <http://moon.ouhsc.edu>)

Quando o tumor deixa de ser confinado ao globo ocular, a manifestação clínica é distinta. Nesses casos, aparece frequentemente uma massa tumoral em órbita, denominada de proptose, e no caso de tumor metastático para o sistema nervoso central, podem aparecer sinais neurológicos focais, anorexia, perda de peso, vômito e cefaléia (MACKAY et al., 1984).

Se descoberto e tratado ainda em estágio inicial, torna-se possível a cura quase completa. Nestes casos, a maioria dos pacientes consegue manter a visão completa em pelo menos um dos olhos (BROADDUS et al., 2009). O tratamento depende do estadiamento da lesão, sendo que a enucleação permanece como a forma mais comum de tratamento (KAMSKI; SINGH, 1994). Entretanto, os recentes avanços no entendimento do RB tem propiciado novas modalidades de tratamento como quimioterapia e tratamento local (placa radioativa, fotocoagulação a laser, termoterapia transpupilar-TTT- e crioterapia) (LUMBROSO et al., 2002; SHIELDS et al., 1994), com o intuito de diminuir a morbidade, manter a função visual e permitir uma melhor sobrevida (FRIEDMAN et al., 2000). Porém, quando não tratado, o RB pode levar a sérias consequências como cegueira e morte (SACHDEVA; O'BRIEN, 2012).

O RB é um tumor que pode se manifestar de forma herdada ou se apresentar de forma esporádica, sendo a forma herdada definida como aquela que se apresenta com histórico familiar, com padrão de herança recessiva com efeito dominante (RAZEK; ELKHAMARY, 2011). A forma mais comum é a esporádica

(90%) que geralmente resulta de mutação espontânea. Os afetados com a forma esporádica apresentam geralmente tumor unilateral e unifocal, existindo, porém, uma minoria com tumores bilaterais (MATEU et al., 1997). As duas formas do tumor não apresentam diferenças histológicas ou clínicas.

Diversos sistemas de estadiamento clínico-patológico existem na literatura, porém o proposto por Reese e Ellsworth (REESE, 1976) é o mais utilizado nos casos de RB intra-ocular. As características tumorais de duas das classificações utilizadas estão demonstradas no Quadro 3 e incluídas em grupos ou classes, dependendo da classificação.

Quadro 3. Sistemas de classificação Reese-Ellsworth e CCG-962 para retinoblastoma. Fonte: Antoneli et al. (2003)

Tabela 1. Estadiamento para tumores intra-oculares - Reese e Ellsworth (1963)	
Grupo 1	Tumor solitário menor do que 4 diâmetros papilares (DP) junto ou atrás do equador do globo ocular. Tumores múltiplos, nenhum maior do que 4 DP, todos junto ou atrás do equador.
Grupo 2	Tumor solitário com 4 a 10 DP, junto ou atrás do equador. Tumores múltiplos, com tamanho de 4 a 10 DP atrás do equador.
Grupo 3	Qualquer tumor anterior ao equador. Tumor solitário maior que 10 DP atrás do equador.
Grupo 4	Tumores múltiplos, alguns maiores do que 10 DP. Qualquer tumor estendendo-se anteriormente a "ora serrata".
Grupo 5	Tumor maciço, envolvendo mais da metade da retina. Sementes vítreas com qualquer tamanho de tumor.
Dioptria (DP) = 1,6 mm	

Tabela 2. Classificação do CCG-962 para tumores extra-oculares	
Classe I	Evidência ao exame anatomopatológico de células tumorais nos canais. Emissários esclerais ou células tumorais espalhadas nos tecidos epiesclerais por ocasião da enucleação.
Classe II	Evidência microscópica de tumor na margem de ressecção do nervo óptico.
Classe III	Tumor orbitário comprovado por biópsia.
Classe IV	Massa tumoral em SNC ou células tumorais no líquido.
Classe V	Metástases hematogênicas para medula óssea, osso ou outros locais, ou disseminação linfática para linfonodos cervicais ou de outras regiões.

Uma característica comum entre as duas formas de retinoblastoma é que o gene retinoblastoma 1 (*RB1*) não é capaz de produzir a proteína supressora de tumor pRb funcional. Esta proteína se liga e inativa fatores de transcrição, como E2F, regulando a progressão do ciclo celular (HELIN et al., 1993). Uma vez que a proteína se torna não funcional, permite a progressão do ciclo da fase G1 para a S (CHOY et al., 2002).

A pRb não funcional é traduzida a partir do gene *RB1* mutado. Esta mutação inclui a inativação dos dois alelos ou perda do gene *RB1*, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q14.2) (SACHDEVA; O'BRIEN, 2012). A maioria dos casos de retinoblastoma, resulta desse tipo de mutação. Porém existem casos de tumores com o gene *RB1* intacto, o que sugere mecanismos alternativos de inativação da

pRb. Foi observado que determinadas oncoproteínas de HPV unem-se à pRb e a inativam, permitindo a replicação viral (DYSON et al., 1989; WHYTE et al., 1988).

2.9.2.1 Retinoblastoma e HPV

A proteína E7 de HPV, como mencionado anteriormente, se liga e inativa a pRb (DYSON et al., 1989), sendo que E7 de HPVs de alto risco interage com maior eficiência que a de HPVs de baixo risco (HECK et al., 1992; MÜNGER et al., 1989b). Existe uma sobreposição considerável nos fatores de risco epidemiológicos para o desenvolvimento de retinoblastoma e infecção por HPV. Dados epidemiológicos e moleculares indicam que o HPV pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do retinoblastoma (BUIRAGO-PÉREZ et al., 2009; MOODY; LAIMINS, 2010; ORJUELA et al., 2000). Em amostras frescas de retinoblastoma, Mohan et al. (2009) detectaram DNA de HPV-16, confirmando os estudos de associação entre o HPV e este tipo de tumor. Em relação ao estadiamento e a presença do HPV, Orjuela et al. (2000) observaram que os tumores HPV positivos apresentavam estádios menos avançados da doença.

2.10 Técnicas para detecção do HPV e suas proteínas

O diagnóstico das lesões malignas e pré-malignas do colo uterino é realizado por três exames: citologia, colpocopia e histologia. Porém, a infecção por HPV é confirmada somente através de métodos moleculares como *Southern blot*, *dot blot*, hibridização *in situ*, Captura Híbrida, clonagem, sequenciamento, alinhamento e análise de similaridade de sequências através de programas computacionais e, principalmente, PCR, a reação em cadeia da polimerase, que tem sido o método mais utilizado na pesquisa e na tipagem de HPV (CLAUS et al., 2009; MIRANDA et al., 2012).

2.10.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e HPV

A PCR é uma técnica que possui alta sensibilidade e especificidade, utilizada com frequência para o diagnóstico de HPV. Para tanto, faz-se uso de iniciadores complementares ao gene L1, permitindo a identificação da maioria dos tipos virais que infectam a região anogenital humana. O par de iniciadores MY09/11 tem sido

bastante utilizado nos trabalhos que visam a detecção molecular de HPV (BALDEZ et al., 2009; MIRANDA et al., 2012; MUNOZ et al., 2013). Eles são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb), tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV (GROSS; BARRASSO, 1999; LANCELOTI et al., 2000;).

Para aumentar a eficiência na detecção, foi desenvolvida uma metodologia baseada no “Nested PCR” (nPCR) empregando os iniciadores MY09/11 e GP5+/6+, consistindo em 2 etapas de amplificação. Alguns pesquisadores sugerem que esta técnica não seja recomendada para rotina diagnóstica por ser mais cara e susceptível à contaminação (HUSNIAK et al., 2000). Por outro lado, outros autores demonstram ser um meio de detecção do HPV extremamente sensível e confiável quando realizada em condições adequadas para evitar contaminações (KAY et al., 2002; MUNOZ et al., 2013; STRAUSS, 2000).

Outro par de iniciadores bastante utilizado para detecção molecular de HPV é o FAP59/64, que foi inicialmente desenhado para detectar vários tipos de HPV em tumores cutâneos e pele normal (FORSLUND et al., 1999). Utilizando-se estes iniciadores, ficou demonstrado que o HPV pode ser encontrado na pele humana saudável, sem qualquer alteração, o que sugere uma natureza comensal destes vírus (ANTONSSON et al., 2000).

O método da PCR pode estar associado à Análise de Polimorfismo de Extensão de Fragmentos de DNA obtidos por digestão do material genético amplificado utilizando-se enzimas de restrição (PCR-RFLP), que detecta mais de um tipo de HPV. O poder discriminatório deste método pode ser utilizado na triagem primária de mulheres em risco de desenvolver neoplasias cervicais (KANESHIMA et al., 2001; MIRANDA et al., 2013), ou seja, com infecção por tipos virais de alto risco.

Foi sugerido que o rastreamento de câncer cervical poderia ser melhorado através da combinação da análise citológica com testes de DNA do HPV (BOULET et al., 2008; COX; CUZICK, 2006; DUNNE; MARKOWITZ, 2006). No entanto, a alta prevalência da infecção pelos papilomavírus significa que estes testes têm baixo valor preditivo positivo (HO et al., 1998; MOLDEN et al., 2005). Como testes de DNA não podem distinguir entre infecção transiente e potencialmente transformante, alguns estudos têm sugerido que análises para a detecção de transcritos de E6/E7 de HPV poderiam ser mais específicas quando se analisa o tipo de infecção com potencial oncogênico (MOLDEN et al., 2005; SOTLAR et al., 2004).

É, portanto, sugerido que os métodos baseados em RNA têm maior valor prognóstico do que aqueles que analisam o DNA e que poderiam desempenhar um papel importante no futuro de programas de triagem (BOULET et al., 2008).

2.10.2 Imunoistoquímica (IHQ)

A técnica de imunoistoquímica (IHQ) é amplamente utilizada em diagnóstico e pesquisa. Na área de virologia, esta técnica detecta revestimento protéico de partículas virais que se encontram nas lesões observadas na microscopia óptica em material incluído em parafina ou em preparados citológicos (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006). Logo que produzida a união antígeno-anticorpo, é possível detectar a estrutura do tecido em que se localiza o antígeno. Embora a imunoistoquímica esclareça esta localização da expressão protéica, é considerada, no entanto, limitada por ser de baixa sensibilidade. Este aspecto pode ser minimizado utilizando-se anticorpos mais específicos, como os monoclonais em detrimento dos policlonais, que embora apresentem aumento no espectro de detecção, não demonstram tanta sensibilidade (RAMOS-VARA, 2005).

Na prática, são utilizados anticorpos policlonais contra antígenos específicos aos vários tipos de HPV (CARVALHO; OYAKAWA, 2000). A IHQ para detecção de partículas virais utilizando anticorpos mono e policlonais, tem relativa baixa sensibilidade, com 50% de positividade nos casos morfológicamente compatíveis com infecção por HPV (KURMAN et al., 1981). A sua principal aplicação, portanto, é concentrada em casos de estudo neoplásico onde se observa uma super-expressão de uma determinada proteína (KOYAMATSU et al., 2003).

Para HPV, atualmente, a técnica é prejudicada pela disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais contra tipos de HPV específicos, devido à falta de propagação do vírus *in vitro*. Os anticorpos comercialmente disponíveis são originados contra antígenos do capsídeo de HPV, com reação cruzada para BPVs (SOUSA, 2001).

2.11 Atividade clastogênica do HPV

Infecção por HPV de células ainda não maduras leva a uma replicação contínua e acúmulo de anomalias genéticas nestas células (DOORBAR, 2005; MÜNGER et al., 2004). As proteínas E6 e E7 induzem estabilidade genômica em

células normais, o que é uma característica de tumores induzidos por HPV de alto risco (WHITE;LIVANOS; TLSTY, 1994). A superexpressão destas oncoproteínas na célula hospedeira leva a uma diminuição das funções da p53 e pRb. Este fato tem como consequência um defeituoso sistema de reparo de DNA (DUENSING; MÜNGER, 2004). A instabilidade cromossômica promove o desenvolvimento de células com aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, fato que tem sido associado com o desenvolvimento de câncer cervical (ATKIN, 1997).

Muitos dos tumores induzidos por HPV apresentam numerosos desbalanceamentos cromossômicos, que incluem ganhos ou perdas de cromossomos inteiros (aneuploidias) e rearranjo cromossômico (ZUR HAUSEN, 1999). Formação de micronúcleos também é uma ocorrência verificada em tumores malignos (LEAL-GARZA et al., 2002) .

2.11.1 A técnica de Ensaio Cometa

A progressão para o câncer inclui eventos de danos no DNA e falhas no sistema de reparo no material genético. Estes danos podem ser causados por diversos agentes mutagênicos, como o tabaco, e facilitados pelo consumo de álcool. (MEYER et al., 2008; MOKTAR et al 2009). Além disso, a presença de HPV na célula hospedeira leva a desestabilização do ciclo celular por meio da ação de suas proteínas oncogênicas (WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2004; ZHANG; TANG, 2012). Alterações citogenéticas em NIC 2/3 já foram relacionadas com a presença de HPV de alto risco (BIERKENS et al., 2012), demonstrando a ação clastogênica viral afetando a estabilidade genômica.

Além dos estudos que analisam danos no DNA em neoplasias cervicais causadas pelo HPV (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2002), são demonstrados também danos causados pelo hábito de fumar e presença de HPV (MOKTAR et al., 2009), fragmentação do DNA em espermatozoides humanos por HPV (CONNELY et al., 2001), entre outros.

Para verificação de danos no DNA, o Ensaio Cometa (EC), também conhecido por eletroforese em gel de célula única (SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*), é uma técnica amplamente aceita como um método padrão para visualizar estas alterações nas células (MCKENNA et al., 2008). Trata-se de uma técnica simples e versátil, que requer poucas células eucarióticas para uma ampla detecção de danos

no material genético (FABIANE et al., 2012; LANGIE et al., 2011). Neste teste, as células são submetidas à eletroforese, promovendo a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras induzidas por agentes mutagênicos, adquirindo a aparência de um cometa (SINGH et al., 1988). A região nuclear compõe a cabeça do cometa enquanto a cauda é formada pelos fragmentos do material genético, cujo comprimento está diretamente relacionada com a intensidade dos danos (HUACHACA, 2002).

2.12 Produção de vacinas contra HPV

A política de vacinação deve ser determinada em cada país e levar em consideração a dimensão da doença, a estrutura dos sistemas de saúde, a capacidade de iniciar e manter um programa de vacinação, a acessibilidade e a relação custo-efetividade comparativamente ao rastreamento (AGOSTI et al., 2007). A vacinologia recebe, hoje, mais investimentos e desperta interesses tanto pela segurança de uso como no retorno financeiro para geração de vacinas de subunidades que utilizam antígenos recombinantes, como é o caso da vacina preventiva para infecções por HPV. A comercialização de vacinas profiláticas e a perspectiva de desenvolvimento de vacinas terapêuticas para tumores associados ao HPV ilustram de forma clara o impacto que a biotecnologia moderna traz para o campo da pesquisa vacinal.

Vacinas profiláticas são desenvolvidas na esperança de bloquear a entrada do vírus e reduzir a incidência de câncer em longo prazo. Duas dessas vacinas estão sendo comercializadas e são baseadas em VLPs (*Virus Like Particles*) formados pelas proteínas L1 de HPV-6, -11, -16 e 18 (Gardasil) ou HPV-16 e -18 (Cervarix). Ambas contêm um sistema adjuvante específico dos seus fabricantes para aumentar a resposta imunológica. Avaliações da eficácia destas vacinas demonstram 100% de proteção contra estes tipos virais no desenvolvimento de lesões intraepiteliais de baixo (LGIL) e alto (HGIL) graus (MOORE et al., 2009). Embora seja um importante passo na batalha contra o câncer cervical, os tipos virais contra os quais estas vacinas fornecem proteção, são responsáveis por apenas 70% de todos os casos de câncer cervical (KJAER et al., 2010). Entretanto, estudos demonstram que as vacinas conferem proteção cruzada contra HPVs dos tipos 31, 45 e 52 (AULT, 2007).

O impacto da vacinação parece ser maior nos países em desenvolvimento, onde o rastreamento ainda não está bem organizado e as taxas de mortalidade por câncer cervical são altas. Contudo, o alto custo pode dificultar o acesso desses países à vacina (NICOLAIDOU; KATSAMBAS, 2007). Nos Estados Unidos, cada dose da vacina quadrivalente custa aproximadamente 120 dólares (MARTI et al., 2007). Na União Europeia, 96 euros. Inicialmente, a vacina no Brasil tinha um alto valor comercial. Porém, houve uma redução de 50% no valor, sendo a Cervarix comercializada por R\$115 a dose, produzida pelo laboratório GlaxoSmithKline (GSK). Nos países em desenvolvimento, a situação dos programas de rastreamento de HPV é ainda deficiente, fazendo com que o maior benefício da vacinação seja a potencial redução de mortes por câncer cervical.

Os benefícios, em cada país, dependem da incidência, mortalidade e custos do tratamento atribuídos ao HPV em cada um deles. Esses dados devem ser comparados com a capacidade protetora das vacinas, eficácia, cobertura necessária e duração da imunidade (BORSTTO et al., 2011). No Brasil, o impacto da vacinação na perspectiva do controle do câncer cervical depende da proporção de casos da doença atribuíveis aos HPV-16 e -18 e da cobertura alcançável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A vacina direcionada aos tipos virais 16, 18, 6 e 11 foi liberada na rede particular de vacinação no país pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sendo indicada para mulheres entre 9 a 26 anos, expostas ou não ao HPV. Em 2014, o Ministério da Saúde incluirá a vacina profilática contra o vírus no calendário de imunizações oferecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A vacinação terapêutica contra o HPV também vem sendo estudada. Trata-se de vacinas quiméricas construídas com epítomos da oncoproteína E7 com a L1, com a geração de VLPs. Este sistema de produção gera um efeito preventivo e terapêutico, com uma resposta imune contra oncoproteínas E7 em modelos animais (ZUR HAUSEN, 2002). Duas destas vacinas estão sendo desenvolvidas pela *Xenova Research*, a TA-CIN, utilizando as proteínas L2, E6 e E7, e a TA-HPV que faz uso das proteínas E6 e E7 do HPV 16 e 18 (LIN et al., 2004).

O desenvolvimento de uma vacina com propriedades terapêuticas para controle do câncer associado à infecção pelo HPV traz perspectivas interessantes em relação ao real benefício em termos de controle da doença. Ao contrário das vacinas profiláticas, espera-se que as vacinas terapêuticas confirmem proteção a

diversos tipos de HPV e previnam o surgimento de tumores em indivíduos já infectados. A disponibilização do tratamento, assim que comprovada sua eficácia terapêutica em ensaios clínicos, para o sistema público de saúde poderá ter um impacto imediato na redução no número de mortes associadas à doença, além de reduzir drasticamente o custo e os traumas associados ao tratamento de tumores em estágios avançados de crescimento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade do HPV pelo perfil clastogênico e por análise de expressão de proteínas virais em amostras de mulheres e crianças afetadas por retinoblastoma, atendidas em um hospital público da cidade do Recife, Pernambuco.

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer através de exame anamnético, em amostra pequena e aleatória, um possível perfil dos pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, em Recife, em relação aos hábitos de vida, de maneira a identificar possíveis cofatores que possam interagir com o vírus do Papiloma Humano no processo de oncogênese;
2. Investigar a presença de seqüências de DNA de HPV em amostras de sangue periférico, nas culturas temporárias de linfócitos correspondentes e amostras cervicais de mulheres do Recife;
3. Investigar a presença de seqüências de DNA de HPV em amostras de tumores de retina, no sangue e nas culturas temporárias de linfócitos de crianças atendidas no centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, na cidade do Recife;
4. Averiguar a atividade clastogênica do vírus nas diferentes amostras de mulheres positivas para HPV;
5. Investigar uma possível expressão de proteínas virais em tecidos oculares de crianças com retinoblastoma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização do estudo e período

As amostras de sangue, material cervical e tumor da retina foram obtidas entre os anos de 2011 a 2013. Os pacientes foram atendidos no município de Recife, capital de Pernambuco, com população de 1.599.513 de habitantes, estimada para 2013 (IBGE/2013). Sua área é totalmente urbana com 94 bairros e seis distritos sanitários e apresenta o segundo maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH, 0,792) referente ao ano 2000, entre as capitais nordestinas. Entretanto, a cidade do Recife apresenta uma sociedade com ampla desigualdade social e pobreza.

As coletas das amostras foram realizadas no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros-CISAM, em Recife, e aquelas de retinoblastoma preservadas em blocos de parafina foram gentilmente cedidas pelo Centro de Oncohematologia Pediátrica- CEONHPE, do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-HUOC, Recife. Todas as análises moleculares de detecção e tipagem viral foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do CEONHPE, enquanto os experimentos de imunoistoquímica e hibridização feitas no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, em São Paulo.

O Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros-CISAM e o Centro de Oncohematologia Pediátrica-CEONHPE- do HUOC atendem tanto pacientes moradores do Recife e sua região metropolitana, como pacientes de cidades interioranas do Estado de Pernambuco, visto que estes Centros são referência no Estado.

4.2 Grupos e seleção de pacientes

Foram formados dois grupos distintos para análise. O Grupo 1 foi constituído de 34 pacientes do sexo feminino, escolhidas aleatoriamente, com e sem lesão no colo do útero, atendidas dentro da rotina no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros-CISAM/UPE, Pernambuco. Foram coletadas amostras de sangue e material cervical destas pacientes.

O Grupo 2 incluiu 20 crianças, de ambos os sexos, com retinoblastoma, atendidas no Centro de Oncohematologia Pediátrica-CEONHPE do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-HUOC/UPE, Pernambuco, para levantamento de dados demográficos e clínicos, com o intuito de traçar o perfil destes pacientes. Dentre

estas, 7 tumores preservados em bloco de parafina, correspondendo a 7 pacientes diferentes, foram analisados quanto à presença viral e suas proteínas. Este grupo (n=7) possuiu um segmento retrospectivo e um prospectivo.

O segmento retrospectivo foi formado por oito amostras de tumor parafinado, cedidos pelo HUOC. O diagnóstico viral para estes pacientes se restringiu à técnica de hibridização *in situ* e a imunohistoquímica foi realizada para análise da expressão das proteínas virais no tecido ocular.

O segmento prospectivo incluiu duas amostras de tumores preservados em parafina. Destas duas pacientes, foi possível a obtenção de tumor fresco na cirurgia de enucleação decorrente da presença de retinoblastoma, além de amostra de sangue periférico. Para estas crianças, o diagnóstico viral foi realizado por métodos moleculares nas amostras de tumores frescos e sangue periférico. Os tumores frescos obtidos por demanda espontânea, posteriormente à cirurgia, foram conservadas em blocos de parafina para posterior análise, incluindo hibridização *in situ* e imunohistoquímica.

4.3 Caracterização das amostras

Das pacientes incluídas no Grupo 1, foram coletadas células cervicais e sangue periférico. Foram coletados dados sociodemográficos e clínicos de cada paciente. As amostras biológicas passaram por diversas análises incluindo detecção, tipagem de HPV e Ensaio Cometa.

Já as amostras obtidas dos pacientes do Grupo 2 foram analisadas para a presença e tipagem de HPV, imunohistoquímica e hibridização *in situ*, além de serem coletados dados clínicos dos pacientes.

4.4 Coleta de material biológico

4.4.1 Coleta de sangue periférico

A coleta de 4mL de sangue dos pacientes do Grupo 1 e do segmento prospectivo do Grupo 2 foi realizada por punção periférica, utilizando-se tubos a vácuo (Vacuette®, Campinas, SP, Brasil) contendo os anticoagulantes EDTA e Heparina. Os tubos contendo EDTA foram utilizados para análises moleculares e

ensaio cometa, enquanto os tubos com heparina foram utilizados para estabelecimento de cultura celular para crescimento de linfócitos. O sangue foi inoculado em meios para cultura de células com o objetivo de extração de DNA e realização do ensaio cometa.

4.4.2 Coleta de células cervicais

Das pacientes incluídas no Grupo 1, foram coletadas amostras de material cervical por meio de esfoliação com escova *cytobrush*[®] no momento de sua consulta de rotina. As escovas com as células cervicais foram mantidas em tampão Tris-EDTA (TE) para posterior extração de DNA.

4.4.3 Obtenção dos tumores de retina

No segmento retrospectivo do Grupo 2, os tumores de retina preservados em blocos de parafina foram gentilmente cedidos pelo Centro de Oncohematologia Pediátrica- CEONHPE, do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-HUOC para a pesquisa.

Já no segmento prospectivo deste mesmo grupo (demanda espontânea de novos pacientes com retinoblastoma), o tumor foi obtido no momento da cirurgia de enucleação. O olho enucleado foi levado ao laboratório em solução salina 0,9 % e posteriormente foi realizado um corte para retirada do tumor intraocular. O tumor foi mantido em RNAlater[®] em freezer -80°C, para posterior extração de DNA, e o restante do material enviado à patologia onde foi emblocado em parafina. Posteriormente, este bloco também foi cedido pelo HUOC para a pesquisa.

4.5 Cultura de linfócitos

As culturas foram realizadas a partir do sangue periférico coletado das pacientes do Grupo 1 e do segmento prospectivo do Grupo 2. Para tanto, foi utilizado meio cariótico Cultilab (meio MEM ou RPMI 1640 com HEPES, soro fetal bovino e fitohemaglutnina), que proporciona a multiplicação de linfócitos *in vitro*. Para tanto, foram inoculadas 18 gotas de sangue em cada frasco de cultura e mantidos em estufa a 37°C por 72 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 1000rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e

ressuspendendo-se o *pellet* em 200µL de PBS (tampão fosfato-salino) ou Tampão Tris-EDTA (TE) para posterior extração de DNA e realização de ensaio cometa. Para o Ensaio cometa, as frascos de cultura foram interrompidos nos intervalos de tempo de 24h e 48h e realizado o mesmo procedimento de centrifugação e ressuspensão.

4.6 Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA foi realizada do material obtido de pacientes inclusas no Grupo 1 (sangue periférico, linfócitos crescidos em cultura e células cervicais) e do material obtido de pacientes do segmento prospectivo do Grupo 2 (sangue periférico, linfócitos crescidos em cultura e tumor de retina fresco), com a utilização do kit *ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System* (Promega®, São Paulo, SP, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do processo de extração, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água (*Nuclease free water*) disponibilizada no kit.

O DNA de tumores parafinados de pacientes inclusos no Grupo 2 foi extraído com a utilização do kit QIAamp® DNA FFPE tissue da QUIAGEN®, seguindo as especificações do fabricante. Para tanto, a parafina foi previamente retirada com o uso de xilol e incubação em banho maria a 65°C por 30 min, sendo este procedimento repetido 4 vezes. O xilol foi retirado com lavagens com álcool 100% e 90%, para evitar a inibição da atividade da proteinase K. Posteriormente, o material foi reidratado com adições subsequentes de álcool 70%, para que, então, fosse extraído o DNA com o kit.

Para quantificação do material extraído, foi utilizado espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000), com alíquotas de 2µL. Uma concentração de cerca de 200 ng/µL de cada amostra foi utilizada na reação de PCR.

4.7 Avaliação da qualidade do DNA extraído

O DNA obtido por extração, tanto do Grupo 1 quanto do Grupo 2, foi submetido à amplificação por PCR com iniciadores específicos para o gene da β -actina humana. Trata-se de um gene estrutural usado como controle da integridade e viabilidade do DNA a ser amplificado. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 µL, utilizando-se o Kit GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega®), 10 pmol/ µL de cada iniciador (BAF e BAR), H₂O Milli-Q e,

aproximadamente, 100 ng/ μ L de DNA. Foi realizado um controle negativo, onde não foi adicionado material genético. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti[®] Thermo Cyclers (Applied Biosystems[®]). As sequências dos iniciadores, bem como a ciclagem utilizada na amplificação por PCR, estão demonstradas na Tabela 1. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese (100V, 400mA), visualizados em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de etídio e fotografados através do equipamento de captura de imagens L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

4.8 Detecção viral por PCR convencional com os iniciadores genéricos MY e GP+

Amostras dos Grupos 1 e 2 foram submetidos a esta análise. Aquelas positivas para o gene da β -actina foram submetidas à amplificação por PCR com iniciadores genéricos MY09/MY11 e GP5+/GP6+. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5 μ L, utilizando-se o Kit GoTaq[®] Green Master Mix 2X (Promega[®]), 10 pmol/ μ L de cada iniciador (MY09/MY11 ou GP5+/ GP6+), H₂O Milli-Q e, aproximadamente 200 ng/ μ L de DNA. Foi realizado controle negativo, que não continha material genético, e positivo, contendo amostra de DNA viral previamente inserido em vetor e clonado (plasmídeos). As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti[®] Thermo Cyclers (Applied Biosystem[®]). As sequências dos iniciadores, bem como a ciclagem utilizada na amplificação por PCR estão demonstradas na Tabela 1. Os produtos de amplificação foram separados por corrida eletroforética (100V, 400mA) em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de etídio, visualizados e fotografados através do equipamento L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

Para análise da presença viral em amostras cujo diagnóstico não foi conclusivo utilizando-se os iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+, foi utilizada a técnica de *nested*-PCR. Para tanto, foram usados como moldes os produtos amplificados por PCR com os iniciadores MY09/MY11 e a PCR secundária consistiu na amplificação de 5 μ L deste produto com os iniciadores GP5+/GP6+, de acordo com Haws et al. (2004).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na análise da qualidade do DNA e na detecção do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados (MANOS et al., 1989; SNIJDERS et al., 1990)

Iniciador	Sequência	Ciclagem	Tamanho esperado do fragmento	Gene alvo
BAF/BAR	BAF: 5'TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAC 3' BAR: 5'TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG 3'	94°C por 4' 94°C por 30" 51,5°C por 30" 72°C por 30" 72°C por 7'	350pb	β-actina humana
MY09/MY11	MY09: 5' CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'	35X 94°C por 4' 94°C por 30" 51,5°C por 30" 72°C por 30" 72°C por 7'	449pb	L1 de HPV
GP5+/GP6+	GP5+: 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3' GP6+: 5' GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC 3'	40X 95°C por 10' 94°C por 60" 42°C por 60" 72°C por 45" 72°C por 4'	150pb	L1 de HPV

4.9 Tipificação viral

As amostras foram submetidas à tipificação viral com a utilização de iniciadores específicos para HPV-16 e -18. A Tabela 2 demonstra as sequências destes iniciadores e a ciclagem a qual foram submetidas na amplificação por PCR. As reações de amplificação tiveram um volume final de 12,5µL, utilizando-se o Kit GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega®), 10 pmol/ µL de cada iniciador (senso e anti-senso), H₂O Milli-Q e, aproximadamente, 200 ng/µL de DNA. Foi realizado controle negativo, que não continha material genético, e positivo, que continha amostra de DNA viral. As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® Thermo Cycler (Applied Biosystem). Os produtos de amplificação foram separados por corrida eletroforética (100V, 400mA) em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de etídio, visualizados e fotografados através do equipamento L.Pix Transilluminator (Loccus Biotecnologia).

Tabela 2. Iniciadores específicos utilizados na tipificação do HPV, suas sequências, ciclagens para amplificação e os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados (KARLSEN et al., 1996).

Iniciador	Sequência	Ciclagem	Tamanho esperado do fragmento	Gene alvo
HPV-16	Forward: 5' GCACAGGGCCACAATAATGG 3' Reverse: 5' GATCAGTTTCCTTTAGGACG 3'	94°C por 5" 95°C por 30" 58°C por 30" 72°C por 60" 72°C por 10" } 35X	119pb	E6-E7
HPV-18	Forward: 5' GCACAGGGTCATAACAATGG 3' Reverse: 5' GATCAAATATCCCCTTGGACG 3'	94°C por 5" 95°C por 30" 55°C por 30" 72°C por 60" 72°C por 10" } 35X	172pb	E6-E7

4.10 Confeção de lâminas histológicas para as técnicas de Imunoistoquímica e Hibridização in situ

Amostras do globo ocular com retinoblastoma provenientes da cirurgia de enucleação foram enviadas à Patologia, onde foram devidamente fixadas com formalina a 37% e inclusas em parafina para construção dos blocos.

Os blocos contendo os tumores foram submetidos à microtomia para confecção dos cortes histológicos para posterior análise por imunoistoquímica e hibridização para o HPV. Foram realizados cortes de 3 µm de espessura com micrótomo (Leica RM 2125 RTS) e aderidos em lâminas silanizadas (Starfrost®).

4.11 Desparafinização dos cortes histológicos de retinoblastoma

Para a retirada da parafina da amostra tumoral, as lâminas foram submetidas a diversos passos que utilizam xilol e álcool. Inicialmente, foram realizadas duas etapas consecutivas de tratamento com Xilol por 30 min cada, seguido de um banho de 30 min em solução xilol + álcool 100% (1:1). Posteriormente, as lâminas passaram por 2 banhos com álcool 100% por 5 min cada, 1 banho com álcool 95% por 5 min e um com álcool 70% por 5 min. Após este processo de desparafinização, as lâminas estavam prontas para serem, então, submetidas aos procedimentos de Imunoistoquímica e Hibridização *in situ*, além do procedimento de coloração HE.

4.12 Lâminas com HE

Para melhor entendimento da morfologia do retinoblastoma, se fez necessária uma coloração sucessiva do núcleo e do citoplasma (SILVEIRA, 2006). A combinação mais comum de corantes usada em histologia e histopatologia é a Hematoxilina e Eosina (HE). A hematoxilina comporta-se como um corante básico e, portanto, cora o núcleo de modo basófilo. A eosina é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A coloração bicrômicas (duas cores) dos cortes histológicos de 3µm de retinoblastoma foi realizado com Hematoxilina e Eosina (HE). Para isso os cortes foram desparafinizados, como descrito anteriormente, e subsequentemente corados por 10 min com Hematoxilina de Mayer (Dako) e submetidos a banhos em água destilada. Posteriormente, os cortes foram corados com Eosina por 30 seg e lavados novamente com água destilada e banhos consecutivos de álcool para retirada do excesso de corante. Finalmente, os cortes foram tratados com xilol para a montagem com lâminulas para posterior análise em microscópio com captura de imagem Carl Zeiss Axio Scope.A1.

4.13 Imunoistoquímica

Foi realizada a análise imunoistoquímica em amostras de tumores de retina obtidas das crianças, com o objetivo de avaliar a presença de proteínas virais neste tecido. Para tanto, foram utilizados tumores incluídos em blocos de parafina, cedidos pelo Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Foram realizados os cortes histológicos e desparafinizados para posterior realização da imunoistoquímica.

A técnica foi realizada com o kit EnVision™ + system-HRP (AEC) (Dako), utilizando-se anticorpos (abcam, Abcam Inc, Cambridge, Londres) para as proteínas fusionadas E1^E4 de HPV-16 (abcam TV G402), para a proteína L1 dos HPVs 1, 6, 11, 16, 18 e 31 (ab2417, abcam) e para a proteína E6 dos HPV-16 e 18 (ab70). Os cortes, montados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados e desidratados com banhos de xilol e álcool a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram submetidas a um tratamento com hidróxido de amônio 10% por 10 min, para retirada de resíduos de formol utilizado na fixação do tumor. Foram realizadas 3 lavagens

com água destilada por 5 min cada. Após esta etapa, foi realizada a recuperação antigênica com tampão Citrato 0,01 M por 20 min no banho maria a 95% e o resfriamento das lâminas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e submetidas ao procedimento de bloqueio da peroxidase endógena por 10 min, com utilização de reagente do kit anteriormente citado, de acordo com as instruções do fabricante. Por se tratar de uma proteína nuclear, os cortes foram tratados com triton 0,01% por 20 min e novamente lavadas com (salina tamponada com Tris) TBS. Foi realizado um bloqueio com Albumina bovina (BSA) 5% por 40 min e posteriormente foi aplicado o anticorpo primário nas amostras de interesse (Quadro 4) enquanto os controles da reação foram incubados apenas com BSA 5%. As lâminas foram deixadas 16-18h a 4°C em câmara úmida.

Após a incubação com anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS-T 2% e, então, aplicado o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Quadro 4), proveniente do kit. As lâminas foram novamente lavadas com TBS-T 2% e, assim, adicionado o cromógeno (Substrate chromogen= 3-amino 9-etilcarbazol =AEC+substrate) (Quadro 4) durante 10 minutos, até o corte começar a apresentar uma coloração avermelhada.

Quadro 4. Anticorpos primários e secundários utilizados na imunoistoquímica com suas respectivas diluições.

	Anticorpos	IHC	Fabricante
Anticorpos primários contra proteínas do HPV	E1^E4 Anti- HPV16 Mouse Monoclonal	DL:1:50	Abcam antibody [8E2] (ab100953)
	E6 Anti-HPV16/18 Mouse Monoclonal	DL: 1:50	Abcam antibody [BPV1/1H8+CAMVI]
	L1 Anti-HPV Mouse Monoclonal	DL:1:100	Abcam antibody [BPV1/1H8+CAMVI]
Anticorpo Secundário/Cromógeno	*Kit Anticorpo Peroxidase Labelled Polymer/ HRP) -anti- mouse 9 / Polímero-HRP- AEC anti- mouse (vermelho)		DAKO K5007

IHC: Imunoistoquímica; **DL:**Diluição dos anticorpos; Polímero – HRP- AEC: Marcação com peroxidase para o cromógeno AEC (3- amino-9 ethylcarbazole contendo peróxido de hidrogênio).

Posteriormente, foram lavadas com água corrente destilada e os cortes contra-corados com Hematoxilina de Mayer (Dako) por 10 minutos. Para retirada do excesso de Hematoxilina, as lâminas foram imersas rapidamente em banho com hidróxido de amônio 0,037M e lavadas com água corrente destilada. Por fim, foi utilizado o meio Faramont (Dako) para montagem com lamínulas.

As análises de imunistoquímica foram realizadas em microscópio com captura de imagem Carl Zeiss Axio Scope.A1.

4.14 Hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada a fim de detectar genes específicos do HPV presente nas amostras de retinoblastoma preservadas em bloco parafina. Para tanto, foi utilizado o kit comercial ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (ZytoVision) e a sonda ZytoFast HPV type 16/18/31/33/35 Probe (ZytoVision, T-1044-440), que hibridiza para os tipos virais HPV-16, 18, 31, 33 e 35, de acordo com as instruções do fabricante.

Trata-se de um protocolo que abrange duas etapas. A primeira engloba os passos já descritos de desparafinização, bloqueio da peroxidase com água oxigenada 10 volumes por 5 minutos cada, lavagens com água destilada, digestão enzimática com Pepsina por 5 min a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, foi realizado um pré-tratamento com banho em EDTA 95% por 15 min, novas lavagens com água destilada e desidratação dos cortes em banhos sucessivos em álcool 70%, 90% e 100% por 1 min em cada. Essas lâminas foram secas e a sonda adicionada sobre o tecido. Os cortes foram, então, cobertos com lamínulas e selados. O material foi denaturado por 5 min a 75° C e a hibridização foi realizada a 37° C por 60 min.

Numa segunda etapa, a lamínula foi retirada e realizada lavagem das lâminas em tampão TBS a 55° C por 5 min para remoção das ligações inespecíficas. Posteriormente foi aplicado o anticorpo primário Mouse-Anti-Dig, incubado por 30 min a 37° C em câmara úmida e retirado o excesso do marcador com banhos sucessivos em TBS. Foi aplicado o Anti-mouse-HRP-polymer, incubado por 30 min a 37°C em câmara úmida e retirado o excesso de amplificador de sinal com lavagens com TBS. Para a marcação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por

10 min e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina Mayer. As lâminas foram desidratadas e diafinizadas antes da montagem.

As análises da hibridização foram realizadas em microscópio com captura de imagem Carl Zeiss Axio Scope.A1.

4.15 Ensaio Cometa

O ensaio cometa alcalino foi realizado, de acordo com Singh *et al.* (1988), em algumas amostras a fim de visualizar quebras duplas no DNA que possam estar relacionados com a presença do vírus. Foram analisadas amostras de sangue periférico, cultura de linfócitos e material cervical de pacientes inclusas no grupo 1.

Para tanto, lâminas de vidro (Knittel, Glasbearbeitungs GmbH, Alemanha) foram lavadas com detergente e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram inseridas em recipiente contendo solução de agarose NMA (*Normal Melting Point*) 1,5% e secas na posição horizontal a 28°C de 16-18h, formando, assim, uma película de agarose na lâmina onde foi aplicado o material biológico. O uso das respectivas concentrações de agarose NMA e LMA (*Low Melting Agarose*) foi escolhido com base em Azqueta *et al.* (2011) e Langie *et al.* (2011), que mostraram que a concentração de agarose pode interferir no momento da cauda, reduzindo a porcentagem de DNA na mesma, à medida que se aumenta a concentração de agarose, de modo que a concentração ótima de LMA deve estar entre 0,6 e 0,8%. Desta forma, a concentração de LMA empregada atende ao valor ótimo proposto.

Alíquotas de sangue periférico foram obtidas diretamente do tubo à vácuo com EDTA, utilizado no momento da coleta por punção periférica. Já os linfócitos, foram mantidos em crescimento na cultura até intervalos de 24h e 48h para monitoramento da clastogenicidade neste sistema. Ao atingir cada intervalo de tempo especificado, as culturas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e resuspenso em 200 µL solução Tris-EDTA pH 8.0.

Dez microlitros do material (sangue periférico ou linfócito) foram misturados a 75 µL de agarose LMA 0.8% a 37°C e aplicados na lâmina previamente preparada com agarose. Uma lamínula foi posicionada recobrindo o material e, posteriormente, essa lâmina foi mantida a 4°C por 20 min. Após este tempo, a lamínula foi retirada e a lâmina submersa em solução de lise (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; Tris-HCl 10 mM) por 1 hora. A solução de lise remove o citoplasma e proteínas

nucleares, mantendo o formato super-helicoidal, como um nucleóide (COLLINS et al., 2001). A partir desta etapa, o trabalho foi realizado com as lâmpadas do laboratório apagadas para evitar a indução de danos no DNA.

A eletroforese foi realizada após a lise (25V, 300mA), seguida de tratamento com solução neutralizadora (Tris-HCl pH 7,5) e álcool 100%. As lâminas foram coradas com 20 µL de Iodeto de Propídeo (4 µg/µL) e visualizadas em microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axio Scope.A1.

O ensaio cometa também foi realizado para verificação de danos em material cervical. Estas células foram mantidas em tampão Tris-EDTA pH 8.0 desde o momento da coleta e levadas ao laboratório em condições resfriadas. O material foi processado dentro de pouco tempo para evitar danos artefatos. Desta suspensão de células foi retirada a alíquota para ser misturada com 75 µL de agarose LMA 0.8% e o procedimento prosseguiu de forma semelhante ao descrito para sangue periférico e material de cultura de linfócitos.

Para classificação do nucleóides, observou-se o tamanho da cauda formada pelos fragmentos de DNA, incluindo-os nas classes de 0 (sem danos) a 2 (dano máximo). O *score* corresponde ao somatório dos valores do número de nucleóides observados por classe multiplicado pelo valor da classe.

4.16. Análises estatísticas

Foi realizada a análise estatística para verificação da associação da presença de HPV com possíveis cofatores e características clínicas que possam estar associados à presença viral e desenvolvimento de câncer nas mulheres do Grupo 1. As características incluídas nas análises fizeram parte do questionário respondido pela paciente. Utilizou-se o *software* BioEstat versão 5.0 (AYRES et al., 2007) com aplicação do Teste Exato de Fisher e *odds ratio* (OR) com intervalos de confiança (IC) de 95%, a fim de determinar se as diferentes categorias estão associadas. Em todos os testes aplicados, o nível de significância considerado foi maior que 0,05 ($p > 0,05$).

Os resultados do ensaio cometa foram analisados estatisticamente com base nos valores de *scores* observados. Inicialmente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade das amostras e o Teste de Mann-Whitney com nível de significância 5%, utilizando-se o *software* BioEstat versão 5.0. Posteriormente, empregando-se o *software* Instat Plus versão 3.036, foram

realizados os testes Kruskal- Wallis e ANOVA, para avaliação de possíveis diferenças estatísticas entre os grupos analisados neste ensaio.

A fim de excluir a hipótese de possível ação genotóxica ocasionada pela incubação em cultura de linfócitos, foi realizado o teste de Regressão Linear Simples com a utilização do *software* Instat Plus versão 3.036 e obtendo-se o Coeficiente de Correlação Linear ou de Pearson (R) e o Coeficiente de Determinação (R^2), em amostras HPV positivas e negativas. Para que este teste seja aceito como significativo, o R^2 deve ser $\geq 0,9$. Os dados foram demonstrados em gráfico.

Ainda para análise dos resultados do Ensaio cometa, gráficos de Blox Plot foram gerados, representando graficamente os dados de associação, com o uso do *software* Instat Plus versão 3.036.

4.17 Considerações éticas

Os pacientes incluídos nos dois grupos foram informados sobre os objetivos da pesquisa, o protocolo e os procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da sua participação no estudo, e convidados a participar do mesmo. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (APÊNDICE 1) e as pacientes do primeiro grupo foram entrevistadas seguindo a ficha anamnética (APÊNDICE 2). A anamnese incluiu informações sobre residência, histórico clínico, escolaridade, tabagismo, etilismo, entre outros. Informações de prontuários foram obtidas de todos os pacientes.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE, sob o número CAAE 0015.0.106.000-11 (ANEXO 1).

5 RESULTADOS

5.1 Grupo 1 (mulheres)

As análises incluíram 34 mulheres atendidas em consulta de rotina no CISAM. Foi possível coletar dados sócio-demográficos e clínicos destas pacientes, além de realizar os testes moleculares propostos para verificação da presença e atividade do HPV nas amostras.

5.1.1 Perfil das pacientes: dados demográficos, comportamentais e clínicos

Foi possível, através de anamnese, reunir informações das pacientes no momento da coleta. Os dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos estão demonstrados na Tabela 3. Pode-se observar um maior número de mulheres incluídas numa faixa etária entre 36-77 anos (55,88%), com alfabetizadas (79,41%) e solteiras/outros (64,70%). Os dados em relação ao comportamento das pacientes demonstram um maior número de mulheres com idade do início da atividade sexual até os 19 anos (76,47%), estando 37,93% inclusas numa faixa etária entre 12 e 15 anos. A maioria (55,88%) teve apenas 2 parceiros sexuais ou mais e até dois filhos (82,35%). Em relação aos hábitos tabagistas e etilistas, 67,64% nunca fumaram e 70,48% das pacientes já consumiram ou nunca beberam. Grande parte das pacientes (52,94%) relataram que já foram diagnosticadas ou possuem alguma alteração no colo do útero, incluindo NIC 1, NIC 2 e NIC 3, além de outras alterações, como inflamações. Adicionalmente, 52,94% não possuem ou não tem conhecimento de histórico familiar de câncer.

Tabela 3. Dados demográficos, características comportamentais e clínicas das mulheres.

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, COMPORTAMENTAIS E CLÍNICAS	n	%
Idade (anos)		
17 – 35	15	44,11
36 – 77	19	55,88
Educação		
Analfabeta	7	20,58
Alfabetizada ≥ 4 anos	27	79,41
Estado civil		
Casada	12	35,29
Solteira/ outros	22	64,70
Iniciação sexual (idade anos)		
12 – 19	26	76,47
≥20	8	23,52
Número de Parceiros Sexuais		
1 parceiro	15	44,11
≥2 parceiros	19	55,88
Multiparidade*		
1-2	28	82,35
Sem filhos	6	17,64
Alteração no colo de útero		
Sim atualmente/já teve	18	52,94
Nunca	16	47,05
HIV positiva		
Sim	6	17,64
Não	28	82,35
Tabagismo		
Sim atualmente/Já fumou	11	32,35
Nunca	23	67,64
Etilismo		
Sim	10	29,41
Já consumiu /Nunca	24	70,48
Histórico familiar de câncer		
Sim	16	47,05
Não	18	52,94

5.1.2 Detecção e Tipagem viral

5.1.2.1 Avaliação da qualidade do DNA extraído

Após extração de DNA, as amostras foram submetidas à verificação de qualidade com amplificação do gene da β -actina. Todas as amostras foram positivas, apresentando a amplificação do fragmento de 350pb, o que confirma a

viabilidade do DNA extraído. A Figura 9 demonstra uma corrida em gel de agarose com alguns produtos amplificados do gene da β -actina.

Figura 9. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene da β -actina. M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C-: controle negativo; 1-5: amostras de sangue periférico, 6-10: amostras de linfócitos crescidos em cultura; 11 e 12: amostras de material

5.1.2.2 Detecção geral do HPV com os iniciadores genéricos pela técnica de PCR

A detecção do gene conservado L1 com os iniciadores MY, utilizando os padrões estabelecidos por Qu et al. (1997), foi observada nas mulheres através da amplificação por PCR em 11 pacientes, com os iniciadores MY. Amostras negativas para este teste foram submetidas à amplificação com iniciadores GP+, resultando em 10 pacientes positivas para a presença de HPV. A Figura 10 exemplifica a detecção viral através do uso dos iniciadores MY (Figura 10-A) e GP+ (Figura 10-B) por PCR.

Figura 10. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR com os iniciadores MY e GP+ para o gene L1 de HPV. M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C-: controle negativo; C+: controle positivo. A) Produtos de PCR amplificados como par de iniciadores MY09/MY11; 1- 3: amostras de sangue periférico negativas para HPV; 4 e 5: amostras de cultura negativas para HPV; 6 e 7: amostras de sangue periférico positivas para HPV. B) Produtos de PCR amplificados como par de iniciadores GP5+/GP6+ ; 1- 3: amostras de sangue periférico negativas para HPV; 4 e 5: amostras de cultura negativas para HPV; 6 e 7: amostras de sangue periférico positivas para HPV.

5.1.2.2.1 *Detecção do HPV pela técnica de nested-PCR*

As amostras negativas para os dois testes de detecção foram submetidas à técnica de *nested-PCR* (EVANDER et al., 1992) com iniciadores GP5+/GP6+ em produtos amplificados por PCR com os iniciadores MY09/MY11. Cinco pacientes anteriormente diagnosticadas como negativas para a presença viral foram positivas quando submetidas a esta técnica. A Figura 11 ilustra estes resultados.

Figura 11. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por *nested-PCR* com os iniciadores MY e GP+ para o gene L1 de HPV. M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C+: controle positivo. 1 e 2: amostras de material cervical e sangue periférico, respectivamente, negativas para HPV; 3: amostra de material cervical positiva para HPV.

5.1.2.3 *Detecção do HPV com iniciadores específicos pela técnica de PCR*

Após a detecção viral identificada em 26 pacientes com o uso de iniciadores genéricos, foi utilizada a técnica de PCR com iniciadores específicos para os tipos HPV-16 e HPV-18. Assim, foi possível detectar o HPV em 18 das 26 pacientes analisadas (69,23%). Amostras consideradas negativas com os iniciadores genéricos (8 pacientes de um total de 34 estudadas) foram, da mesma forma, testadas com iniciadores específicos e foi possível considerar que, destas 8, 3 foram positivas para o vírus (Tabela 4). Um total de 21 pacientes, portanto, foram positivas para HPV-16 e/ou HPV-18. O tipo mais frequente encontrado foi o HPV-16, detectado em 17 amostras, enquanto que o HPV-18 foi encontrado em 12 amostras. A Figura 12 representa amostras positivas para HPV-16 (6-A) e HPV-18 (6-B). Os produtos visualizados em gel de agarose consistiram em bandas de 119 pb para

HPV-16 e 172 pb para HPV-18. Os resultados detalhados de detecção/ tipagem viral nas mulheres estão demonstrados no Tabela 4.

Na análise do sangue periférico das 21 pacientes positivas para HPV com o uso de iniciadores específicos, os tipos 16 e 18 foram detectados no sangue periférico de 15 pacientes, sendo o tipo mais frequente encontrado o HPV-18 (11 amostras - 52,38%), enquanto o HPV-16 foi detectado em 9 das 15 mulheres (42,85%). A presença simultânea dos dois tipos virais detectada em sangue periférico foi identificada em 5 pacientes, representando 23,80% das amostras de sangue positivas para o vírus analisadas (Tabela 4). A Figura 12 representa amostras positivas para HPV-16 (12-A, colunas 3 e 4) e HPV-18 (12-B, coluna 3).

Após as análises das culturas de linfócitos realizadas com amostras de sangue, foi possível detectar os os dois tipos específicos testados. O HPV-16 foi encontrado em 9 das 21 pacientes consideradas positivas para HPV-16 e/ou HPV-18, correspondendo a 42,85%, e o HPV-18 detectado em 4 amostras (19,04%). A presença simultânea dos dois tipos em cultura foi detectada em 3 amostras (14,28%) (Tabela 4). A Figura 12 representa amostras positivas para HPV-16 (12-A, colunas 6 e 7) e HPV-18 (12-B, coluna 10).

Células provenientes de esfoliação cervical, foram submetidas à detecção de tipos específicos de HPV. Das 21 mulheres positivas para os tipos testados, em amostras de material cervical foi possível detectar o HPV-16 em 10 amostras (47,61%) e o HPV-18 em 5 (23,80%). Neste tipo de amostra biológica, a presença simultânea dos dois tipos virais foi encontrada em 3 pacientes (14,28%) (Apêndice 1). A Figura 12 representa amostras positivas para HPV-16 (12-A, colunas 10 e 11) e HPV-18 (12-B, coluna 11).

Figura 12. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para HPV-16 (A) e HPV 18 (B) (região E6/E7). M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C-: controle negativo; C+: controle positivo. A) Produtos de PCR amplificados para HPV-16; 1 e 2: amostras de sangue periférico negativas; 3 e 4 e 5: amostras de sangue periférico positivas; 5: amostra negativa de cultura de linfócitos; 6 e 7: amostras positivas de cultura de linfócitos; 8 e 9: amostras de material cervical negativas; 10 e 11: amostras de material cervical positivas. B) Produtos de PCR amplificados para HPV-18; 1, 2, 4 e 5: amostras de sangue periférico negativas para HPV; 3: amostras de sangue periférico positiva; 6-9: amostras de cultura de linfócitos negativas; 10: amostra de cultura de linfócitos positiva; 11: amostra de material cervical positiva.

Os resultados de detecção e tipagem viral para o Grupo 1 estão demonstrados de forma detalhada na Tabela 4, evidenciando dados de detecção geral e específica para cada amostra coletada. Os resultados se sobrepõem, uma vez que cada paciente possui os três tipos amostrais (sangue periférico, cultura de linfócitos e células cervicais), além de casos de coinfeção viral, podendo o total não condizer com o n amostral (n=34).

Tabela 4. Resultados de detecção do HPV, geral e específica, nas amostras biológicas das mulheres (n=34).

Amostra	Detecção geral de HPV*		Detecção específica de HPV**	
	Positivos n=29	Negativos n=5	HPV-16 n (%)	HPV-18 n (%)
Sangue periférico	18	16	09	11
Cultura de linfócitos	09	24	09	04
Células cervicais	18	16	10	05

*Resultados referentes à detecção geral de HPV realizada com iniciadores genéricos; **Resultados referentes à detecção específica de HPV realizada com iniciadores específicos.

5.1.3 Detecção e tipagem viral X dados sociodemográficos

Foi realizada uma análise da possível correlação entre os fatores sociodemográficos e dados clínicos com a presença viral. Os testes foram também realizados em relação ao tipo viral (HPV-16 e 18) detectado em cada amostra. A tabela 4 demonstra resultados de detecção viral considerando-se o uso de todos os iniciadores (genéricos e específicos) no presente estudo.

Pode-se observar uma maior incidência de HPV em mulheres mais jovens (48,27%), alfabetizadas (79,31%), solteiras (48,27%), com início de atividade sexual antes dos 20 anos de idade (37,93%), com um parceiro sexual ao longo da vida (48,27%), mulheres que tiveram 1 ou 2 filhos (44,82%), com algum tipo de alteração no colo do útero (51,72%), que nunca fumaram 20 (68,96%) e que bebem ou já beberam (68,96%). Não foi possível obter associação significativa entre as variáveis e a presença viral (Tabela-5).

Tabela 5. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas, comportamentais e clínicas e a detecção viral com iniciadores genéricos em mulheres atendidas no CISAM/UPE no período de 2012 a 2013.

Variáveis	Detecção do HPV**		p*	OR (95% IC)	p**
	Positivo n= 29 (%)	Negativo n= 5 (%)			
Idade (anos)					
17 - 35	14 (48,27)	01 (20,00)	0,251	3,732	0,491
36 - 77	15(51,72)	04 (80,00)		(0,37-35,58)	
Educação					
Analfabeta	06 (20,68)	01(20,00)	0,731	0,983	0,573
Alfabetizada ≥ 4 anos	23 (79,31)	04(80,00)		(0,09-10,23)	
Estado civil					
Casada	10 (34,48)	02 (40,00)	0,587	1,266	0,788
Solteira /outros	19 (65,51)	03 (60,00)		(0,18-8,86)	
Iniciação sexual (idade anos)					
12 -19	22 (75,86)	04 (80,00)	0,666	1,272	0,712
≥20	07 (24,13)	01 (20,00)		(0,12-13,35)	
Número de Parceiros Sexuais					
1 parceiro	14 (48,27)	01 (20,00)	0,251	3,734	0,491
≥ 2 parceiros	15(51,72)	04 (80,00)		(0,37-35,58)	
Multiparidade					
≥1	23 (79,31)	05 (100)	*	*	*
Sem filhos	06 (20,68)	0			

Tabela 5 continuação. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas, comportamentais e clínicas e a detecção viral com iniciadores genéricos em mulheres atendidas no CISAM/UPE no período de 2012 a 2013.

Alteração no colo de útero					
Sim atualmente / já teve	15 (51,72)	03 (60,00)	0,558	0,714 (0,10-4,92)	0,886
Nunca	14 (48,27)	02 (40,00)			
HIV positiva					
Sim	04 (13,79)	02 (40,00)	0,205	0,240 (0,03-1,91)	0,432
Não	25 (86,20)	03 (60,00)			
Tabagismo					
Sim atualmente / Já fumou	09 (31,03)	02 (40,00)	0,527	0,675 (0,09-4,76)	0,903
Nunca	20 (68,96)	03 (60,00)			
Etilismo					
Sim	10 (34,48)	0	*	*	*
Já consumiu/ Nunca	19 (65,51)	05(100)			
Histórico familiar de câncer					
Sim	14 (48,27)	02 (40,00)	0,558	1,400 (NA)	0,886
Não	15 (51,72)	03 (60,00)			

* Não foi realizada análise estatística por apresentar caselas zeradas;

** Resultados referentes à detecção geral e específica do HPV;

p^* = Teste Exato de Fisher; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança; p^{**} = OR.

5.1.4 Ensaio cometa

A técnica de ensaio cometa foi utilizada para tentar observar os níveis de clastogenicidade em células infectadas com HPV. Essa investigação foi realizada em sangue periférico, células cervicais e em diferentes intervalos de cultivo (0h, 24h e 48h) de 13 pacientes incluídas no Grupo 1.

Para tanto, foram contabilizados 100 nucleóides por amostra e classificadas em 0 (sem danos), 1 (dano intermediário) e 2 (dano máximo) como demonstra a Figura 13. O número de nucleóides encontrados por classe foi multiplicado pelo valor da classe respectiva, resultando no Score do Cometa.

Figura 13. Núcleos e fragmentos do material genético corados com iodeto de propídeo. A: cometa classe 0; B: cometa classe 1; C: cometa classe 2.

Os resultados deste Ensaio estão demonstrados na tabela 6, evidenciando o número de nucleóides por classe, além do score, por tipo de amostra analisada.

Tabela 6. Ensaio Cometa em diferentes amostras biológicas provenientes das pacientes atendidas no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros- CISAM.

Material	Classes			Score
	0	1	2	
SP/C0h	1210	42	48	138
C24h	1152	97	46	189
C48h	1143	98	55	208
Cyt	1046	50	204	459

SP/C0h: sangue periférico correspondente ao intervalo 0h da cultura de linfócitos; C24h: linfócitos cultivados *in vitro* durante intervalo de 24h; C48h: linfócitos cultivados *in vitro* durante intervalo de 48h; Cyt: células cervicais

Inicialmente, foram realizadas algumas comparações simples entre os valores de scores obtidos das diferentes amostras analisadas. Enquanto a primeira comparação foi realizada entre os scores de sangue periférico (SP) e células cervicais (Cyt) de pacientes HPV-positivas e negativas (Figura 14), uma segunda foi feita entre os valores de scores nos intervalos do cultivo de linfócitos (0h, 24h e 48h) (Figura 15).

Figura 14. Níveis de clastogenicidade na presença de HPV em sangue periférico e células cervicais. Cyt: material cervical obtido por esfoliação com *cytobrush*[®]; SP: sangue periférico; 48h: linfócitos crescidos em cultura por 48h. 24, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34 e 35: amostras positivas para HPV.

A Figura 15 ilustra comparações entre Scores alcançados nas análises do Ensaio Cometa para linfócitos periféricos, demonstrando os níveis de clastogenicidade nos diferentes intervalos de cultivo, tanto em pacientes negativas para o vírus como naquelas HPV positivas.

Figura 15. A e B: Níveis de clastogenicidade na presença de HPV em linfócitos periféricos (0h) crescidos em cultura nos intervalos de 24h e 48h. 24, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34 e 35: amostras positivas para HPV; 25, 28 e 29: amostras negativas para HPV.

Análises estatísticas foram realizadas a fim de verificar diferenças significativas entre resultados de *scores* obtidos das diferentes amostras analisadas pelo Ensaio Cometa. Inicialmente, foi realizado o Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk, tanto nas amostras HPV-positivas quanto nas HPV-negativas (Tabela 7).

Tabela 7. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk nas amostras de cultivo de linfócitos e material cervical de mulheres HPV-positivas e negativas.

	HPV +				HPV -			
	0h	24h	48h	Cyt	0h	24h	48h	Cyt
Média	14,0000	20,2500	23,2500	53,5000	5,2000	5,4000	5,6000	6,0000
Desvio padrão	7,2703	11,6925	12,4642	70,4455	2,5884	3,1305	1,1403	4,3012
W	0,9376	0,9178	0,9001	0,7605	0,7655	0,9309	0,9607	0,8853
P	0,5556	0,4297	0,3424	0,0140	0,0540	0,5298	0,7593	0,3620

Posteriormente, com base nos valores de *scores* de cometas, foi realizado o teste não paramétrico para amostras independentes (teste de Mann-Whitney), com nível de significância de 0,05, usando o programa BioEstat 5.3. Os valores estatísticos (U, Z(U) e p) são mostrados na Tabela 8, onde foram constatadas diferenças significativas entre amostras de cultura de linfócitos HPV+ e HPV- ($p=0,0338$, $p=0,0079$ e $p=0,0022$, para C0h, C24h e C48h, respectivamente) Entretanto, não foi observada diferença entre amostras de Cyt de pacientes com ou sem infecção viral (Tabela-8).

Tabela 8. Scores dos Cometas observados em 8 pacientes HPV positivas e 3 HPV negativas , seguidos dos valores estatísticos do teste de Mann- Whitney (U, Z(U) e *p*) em macrocultura de linfócitos em intervalos de 0h, 24h e 48h e material cervical obtido por esfoliação.

Amostra/Grupo	HPV + (n=8)	HPV – (n=5)	U	Z(U)	<i>p</i>
SP/C0h	14	3	5,50	2,1226	0,0338
	7	8			
	4	8			
	8	3			
	21	4			
	14	-			
	24	-			
C24h	20	-	3,50	2,4154	0,0079
	16	10			
	7	2			
	12	7			
	34	4			
	25	4			
	36	-			
C48h	26	-	0,50	2,8545	0,0022
	6	-			
	18	4			
	8	7			
	7	6			
	37	5			
	17	6			
Cyt	32	-	10,0	1,4639	0,0716
	28	-			
	33	-			
	6	12			
	5	9			
	3	2			
	6	3			
	184	4			
	12	-			
	129	-			
	83	-			

SP/C0h: sangue periférico correspondente ao intervalo 0h da cultura de linfócitos; C24h: linfócitos cultivados *in vitro* durante intervalo de 24h; C48h: linfócitos cultivados *in vitro* durante intervalo de 48h; Cyt: células cervicais.

Como as amostras de células cervicais (Cyt) das pacientes HPV-positivas não apresentaram normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (nível de significância 0.5) para comparar a ação clastogênica nos diferentes tipos de amostras de pacientes positivas para o vírus. Já para as HPV- negativas, foi realizada a ANOVA paramétrica.

Para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos independentes, foi realizado o teste de variância não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para tanto, foram feitas comparações entre os scores dos diferentes intervalos da cultura de linfócitos e das células cervicais. Para as pacientes HPV-positivas não se obteve diferença estatística significativa entre os grupos ($H=2,0994$ e $p= 0,5520$). A Figura 16 demonstra o gráfico Box Plot para visualização gráfica dessas comparações.

Figura 16. Comparação gráfica entre *scores* de cometas observados em amostras de cultura de linfócitos (0h, 24h e 48h) e células cervicais (Cyt) de pacientes HPV-positivas

A fim de avaliar a ação clastogênica nos intervalos de cultivo de linfócitos *in vitro* em função do tempo, foi realizada uma regressão linear simples nas pacientes HPV-positivas (Figura 17). A análise de regressão demonstrou um coeficiente de determinação (R^2)= 0,9313 e o coeficiente de Pearson (R)= 0,9650. Os resultados apontaram uma correlação positiva entre o tempo de cultivo e danos no DNA que pode ser descrita através da seguinte equação da reta: $Score = 117.3 + 1.417 \times \text{intervalo de tempo}$.

Figura 17. Reta de regressão linear em amostras de cultivo de linfócitos HPV-positivas, demonstrando uma correlação positiva. Os valores dos scores no eixo Y do gráfico, correspondem ao somatório dos scores de cada grupo (intervalo de cultura). O eixo X demonstra os intervalos de tempo em horas (0h, 24h e 48h) de cultivo de linfócitos.

Como as amostras das pacientes HPV-negativas apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizada uma ANOVA paramétrica, com nível de significância de 0,5, empregando o programa BioEstat 5.3. Os dados não revelaram diferenças estatísticas significativas ($F=0,0643$, $p=0,9774$) entre as amostras de sangue e células cervicais, assim como observado nas pacientes HPV+. A Figura 18 demonstra uma representação gráfica dessas comparações.

Figura 18. Comparação gráfica entre scores de cometas observados em amostras de cultura de linfócitos (0h, 24h e 48h) e células cervicais (Cyt) de pacientes HPV-negativas

Assim como nas amostras HPV-positivas, foi realizada uma regressão linear simples nas pacientes HPV-negativas (Figura 19). A análise de regressão demonstrou um coeficiente de determinação (R^2)= 0,8660 e o coeficiente de Pearson (R)= 0,75.

Figura 19. Reta de regressão linear em amostras de cultivo de linfócitos HPV-negativas, demonstrando uma correlação positiva. Os valores dos scores no eixo Y do gráfico, correspondem ao somatório dos scores de cada grupo (intervalo de cultura). O eixo X demonstra os intervalos de tempo em horas (0h, 24h e 48h) de cultivo de linfócitos. Equação da reta: $\text{Score} = 19,33 - 0,0417 \times \text{intervalo de tempo (h)}$.

Hábitos de tabagismo e etilismo também foram analisados em relação ao nível de danos no DNA na presença do vírus. Para tanto, valores de scores de diferentes amostras das pacientes HPV-positivas tabagistas e/ou etilistas foram cruzados com pacientes HPV-positivas não tabagistas e não etilistas. Devido ao baixo número amostral em cada categoria, não foi possível inferir resultados estatísticos para esta análise, sendo observados apenas 3 pacientes HPV-positivas tabagistas e/ou etilistas e 5 pacientes HPV-positivas não tabagistas e/ou não etilistas.

5.2 Grupo 2 (crianças)

Foram incluídas neste Grupo, 20 crianças para determinação do perfil destes pacientes. Já para análises experimentais, apenas sete destas crianças foram incluídas, sendo divididas em dois segmentos: retrospectivo (n=5) e prospectivo (n=2). No segmento retrospectivo, foram analisados oito tumores de retina preservados em blocos de parafina, enquanto o segmento prospectivo abrangeu a análise de tumores frescos e parafinados de duas crianças, além de amostras de sangue periférico.

5.2.1 Perfil dos pacientes: dados demográficos e clínicos das crianças

Para traçar o perfil dos pacientes com retinoblastoma dos segmentos retrospectivo e prospectivo do Grupo 2, foram reunidas informações de prontuário sobre os mesmos. Para tanto, dados de prontuário de 20 pacientes foram analisados para as principais características demográficas e clínicas (Tabela 9). O estadiamento não foi incluído na análise, uma vez que o sistema utilizado para classificação tumoral era diferente de um paciente para o outro, sendo inclusas três classificações: a classificação de Reese-Ellsworth, a de CCSG e a classificação de Grabowski.

Tabela 9. Dados demográficos, características comportamentais e clínicas das crianças com retinoblastoma (n=20).

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS		n	%
Idade ao diagnóstico	< 12 meses	1	5
	12-36 meses	15	75
	> 36 meses	4	20
Sexo	Feminino	7	35
	Masculino	13	65
Procedência	Recife	0	0
	Região Metropolitana	1	5
	Interior do Estado	15	75
	Outros	4	20
Lateralidade do tumor	Unilateral	13	65
	Bilateral	7	35
Proporção com doença	Intra-ocular	13	65
	Extra-ocular	7	20
Histórico familiar de câncer	Sim	10	50
	Não	10	50

5.2.2. Detecção e tipagem viral

5.2.2.1. Avaliação da qualidade do DNA extraído

O DNA extraído das amostras do segmento prospectivo do Grupo 2 foi testado quanto a sua qualidade, sendo submetidas à amplificação do gene da β -actina. As amostras foram positivas, confirmando a viabilidade do DNA a ser utilizado nas reações de amplificações por PCR para detecção e tipagem viral. A Figura 20 demonstra uma corrida em gel de agarose com alguns produtos amplificados do gene da β -actina.

Figura 20. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene da β -actina. M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C-: controle negativo; 1 e 2: amostras de retinoblastoma do segmento prospectivo do Grupo 2.

5.2.2.2. Detecção do HPV com os iniciadores genéricos pela técnica de PCR

A detecção do gene conservado L1 com os iniciadores GP5+/GP6+ utilizando os padrões estabelecidos por Qu et al. (1997) foi observada nas duas crianças através da amplificação por PCR. Não foi possível detectar o vírus pelo uso de iniciadores MY09/MY11. A Figura 21 demonstra a detecção viral nas amostras de retinoblastoma com os iniciadores GP+. Não foi realizada a técnica de *nested*-PCR para as crianças, visto que já havia sido confirmada a presença de HPV com estes iniciadores.

Figura 21. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para o gene L1 de HPV com os iniciadores GP5+/GP6+. M: marcador molecular de 50pb (Promega®); C-: controle negativo; C+: controle positivo; 1 e 2: produtos de PCR positivos em amostras de retinoblastoma do segmento prospectivos do Grupo 2.

5.2.2.3. Detecção específica do HPV em crianças do segmento prospectivo do Grupo 2

Com a técnica de PCR, utilizando-se iniciadores específicos para HPV-16 e 18, foi detectada a presença de HPV-16 em amostras biológicas das pacientes. Os resultados de detecção/ tipagem viral nas crianças estão demonstrados na Tabela 10.

Na análise do sangue periférico das crianças incluídas no segmento prospectivo do Grupo 2, o HPV-16 foi detectado em apenas 1 paciente, enquanto o HPV-18 não foi detectado em nenhuma amostra de sangue (Tabela 10). A Figura 22 demonstra o produto amplificado para o tipo viral detectado.

Quando foram analisadas as culturas de linfócitos inoculadas com amostras de sangue periférico, observou-se a presença apenas do HPV-16 em uma das pacientes, assim como em apenas 1 paciente foi detectado o Tipo HPV-16, quando analisadas amostras de tumor fresco obtidas em cirurgia de enucleação, no segmento prospectivo do Grupo 2 (Figura 22).

Figura 22. Corrida eletroforética em gel de agarose a 2% com produtos amplificados por PCR para HPV-16 em amostras de sangue periférico (A) e tumor de retina (B). M: marcador molecular de 100pb (Promega®); C-: controle negativo; C+: controle positivo. A) 1: paciente negativa para HPV-16, 2: paciente positiva para HPV-16; B) 1: paciente negativa para HPV-16, 2: paciente positiva para HPV-16

A Tabela 10 demonstra resultados detalhados de detecção de HPV nos pacientes com retinoblastoma.

Tabela 10. Resultados de detecção do HPV, geral e específica, nas amostras biológicas das crianças (n=2)

PACIENTE	MATERIAL BIOLÓGICO	MY	GP+	HPV-16	HPV-18
1	SP	-	-	-	-
	C	-	+	+	-
	Ret	-	+	-	-
2	SP	-	-	+	-
	C	-	-	-	-
	Ret	-	+	+	-

SP: sangue periférico; C: linfócitos crescidos em cultura; Ret: tumor; +: amostra positiva para HPV; - : amostra negativa para HPV.

5.2.3 Imunoistoquímica

Esta técnica foi realizada em amostras de retinoblastoma conservadas em blocos de parafina, tanto de pacientes do segmento retrospectivo quanto prospectivo. Foi possível observar imunomarcagem das proteínas L1, E6 e da proteína conjugada E1^E4. Diferentes regiões de marcação foram evidenciadas, incluindo, tumor, retina, nervo óptico e córnea, além de infiltrados inflamatórios próximos à região tumoral. Inicialmente foi realizada a técnica de HE para verificação da histologia ocular. A Figura 23 demonstra a técnica de coloração HE no tecido analisado.

Figura 23. Tecido ocular corado através da técnica de HE. Aumento de 4X. A: E= esclera; C= coróide; T= tumor de retina. B: E= esclera; C= coróide.

Características específicas do retinoblastoma como as rosetas de *Flexner-Wintersteiner*, foram observadas no corte (Figura 24), confirmando o diagnóstico para o tumor de retina.

Figura 24. Corte histológico de retinoblastoma, evidenciando as rosetas de *Flexner-Wintersteiner* formadas pelo arranjo de células tumorais (setas).

Os testes de imunoistoquímica realizados com anticorpo contra a proteína L1 demonstraram marcações evidentes em núcleos das células tumorais e em núcleos de células de infiltrados inflamatórios, além de marcações em células nervosas e endoteliais do nervo óptico, como demonstra a Figura 25

Figura 25- Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- L1 (HPVs 1, 6, 11, 16, 18 e 31). A: controle negativo da reação, objetiva de 10X. B: marcação em células tumorais, objetiva de 20X. C: marcação no nervo óptico, seta preta: marcação em células nervosas, seta vermelha: marcação em células endoteliais aumento de 20X D: Marcação na região mais externa da esclera, aumento de 100X; setas indicam células marcadas.

Já as imunomarcações para a proteína fusionada E1⁺E4 foram evidentes na lâmina nuclear interna e ganglionar da retina, e no citoplasma das células tumorais e núcleos de infiltrados inflamatórios próximos à região tumoral (Figura 26)

Figura 26- Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo monoclonal para as proteínas fusionadas E1^E4 anti HPV-16. As setas nas diversas imagens indicam regiões de marcação. A e B: controle negativo da reação (objetivas de 4X e 10X, respectivamente). C: marcação D: marcação evidente no epitélio corneal (objetiva de 20X). E e F: Marcação em células da retina (objetiva de 40X).

A Figura 27 evidencia detalhes de imunomarcações para as proteínas conjugadas E1^E4 de HPV-16 em regiões de infiltração inflamatória (Figura 27- A e B) e células tumorais (Figura 27- C e D).

Figura 27- Imunomarcaco em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- E1^E4 (HPV-16) em detalhe. As setas nas diversas imagens indicam regies de marcao. Regio mais externa da esclera (A, objetiva de 10X) com marcaes evidenciadas em suas clulas (B, objetiva de 100X). Regio tumoral (C, objetiva de 10X) com marcaes evidenciadas em suas clulas (D, objetiva de 100X)

Testes de imunoistoqumica tambm foram realizados para marcao da protena E6 de HPV. Foi possvel evidenciar imunomarcaes para esta oncoprotena nas lminas nucleares da retina, principalmente na lmina nuclear interna, no citoplasma das clulas tumorais e infiltrados inflamatoros prximo regio do tumor e, ainda, marcaes em clulas nervosas e endoteliais do nervo ptico (Figura 28).

Figura 28- Imunomarcção em tecido ocular com retinoblastoma para o anticorpo anti- E6 (HPV-16 e 18). As setas nas diversas imagens indicam regiões de marcação. A e B: controle da reação (objetiva de 10X); C: marcação evidente no epitélio corneal (objetiva de 20X); D: marcação em diferentes camadas da retina objetiva de 40X); E e F: marcação nas células tumorais (objetivas de 20X e 40X, respectivamente). G e H: marcação no nervo óptico, em células nervosas (objetivas de 20X e 40X, respectivamente).

A Tabela 11 resume os anticorpos utilizados com as respectivas áreas de imunomarcação.

Tabela 11. Anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica e as respectivas regiões marcadas.

Anticorpos primários	Córnea	Retina	Células tumorais	Nervo óptico
E1+E4 Anti-HPV16 Mouse Monoclonal	Epitélio Corneal	Preferencialmente na lâmina nuclear interna e ganglionar	Citoplasma das células tumorais e núcleos de infiltrados inflamatórios	N/M
E7 Anti-HPV18 Mouse Monoclonal	?	?	?	?
E6 Anti-HPV16/18 Mouse Monoclonal	N/M	Preferencialmente na lâmina nuclear externa e interna	Citoplasma das células tumorais e em infiltrados inflamatórios próximos a região	Marcação evidente no núcleo e no citoplasma das células
L1 Anti-HPV Mouse Monoclonal	N/M	N/M	Núcleo das células tumorais e em núcleos de infiltrados inflamatórios	Marcação evidente no núcleo e no citoplasma das células

N/M: não marcado

5.2.4 Hibridização *in situ*

Com a técnica de hibridização *in situ* foi possível observar áreas hibridizadas em retinoblastoma, utilizando-se a sonda para os tipos HPV-16, 18, 31, 33 e 35.. Essas marcações foram evidentes em células tumorais, nas camadas de retina e células nervosas e endoteliais do nervo óptico, como demonstram as Figuras 29 e 30.

Figura 29. Hibridização *in situ* para HPVs em retinoblastoma, utilizando-se o cromógeno DAB. As setas nas diferentes imagens indicam áreas hibridizadas. A e B: controle da reação (objetvas de 10X e 20X, respectivamente); C: núcleos das camadas da retina hibridizada (objetiva de 10X); D: núcleos das células tumorais e da retina hibridizados (objetiva de 20X); E e F: núcleos das células tumorais hibridizadas (objetiva de 20X).

Figura 30. Hibridização *in situ* para HPVs em retinoblastoma, utilizando-se o cromógeno Green. As setas nas diferentes imagens indicam áreas hibridizadas. A, B e C: marcação em células tumorais (objetivas de 40X, 10X e 20X, respectivamente); D e E: marcação nas camadas da retina (objetiva de 20X); F, G e H: marcação no nervo óptico (objetivas de 40X)

A Figura 31 demonstra comparações entre resultados das técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ*, para as mesmas regiões de marcação.

Figura 31. Comparativo entre hibridização *in situ* e imunomarcção para HPVs em retinoblastoma, utilizando-se os cromógenos Green e DAB. A, C e E: hibridização é áreas de retina, tumor e nervo óptico, respectivamente. B, D e F: imunomarcção em áreas de retina, tuor e nervo óptico, respectivamente. A, C, E e F: objetiva de 20X. B e D: objetiva de 40x.

Resumidamente, a partir dos resultados moleculares, de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, foi possível inferir que, das 7 crianças incluídas no Grupo 2, 6 foram positivas para HPV e apenas 1 foi considerada negativa para os tipos virais testados.

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

Para elucidação de mecanismos genéticos envolvidos na iniciação e progressão do câncer, o uso de modelos experimentais favorece abordagens múltiplas, sendo muito atraentes aqueles modelos em que é possível lograr não apenas o entendimento de mecanismos, mas também contribuições para controle das enfermidades associadas. Neste sentido, o papilomavírus se ressaltou devido a sua ligação na oncogênese como agente causal de neoplasias e por sua ação associada a fatores ambientais. A pesquisa que envolve análise da prevalência de HPV e/ou cofatores ambientais relacionados à infecção viral deve levar em consideração as particularidades do local de estudo, visto que estes fatores podem variar entre diferentes populações e regiões geográficas (CASTELLSAGUE; MUNÓZ, 2003; ZUR HAUSEN, 2009). Análises da atividade do HPV pela evidência de suas proteínas na amostra e danos no material genético da célula hospedeira foram realizadas a fim de contribuir para compreensão destas questões. A multiplicidade de técnicas utilizadas justifica o tamanho amostral, visto que o presente estudo não se trata de análises de prevalência e sim uma investigação da expressão viral e comparação em diferentes tecidos por técnicas variadas.

No presente estudo, foi possível traçar um perfil das mulheres incluídas no Grupo 1, a partir de dados obtidos através da anamnese. Estas pacientes foram atendidas na cidade do Recife e residem nesta mesma cidade, região metropolitana e em outros Estados. Pode-se observar um maior número de mulheres incluídas numa faixa etária entre 36-77 anos (55,88%), com alfabetizadas (79,41%) e solteiras/outros (64,70%). Os dados em relação ao comportamento das pacientes demonstram um maior número de mulheres com idade do início da atividade sexual até os 19 anos (76,47%), estando 37,93% inclusas numa faixa etária entre 12 e 15 anos. A maioria (55,88%) teve apenas 2 parceiros sexuais ou mais e até dois filhos (82,35%). Em relação aos hábitos tabagistas e etilistas, 67,64% nunca fumaram e 70,48% das pacientes já consumiram ou nunca beberam. Grande parte das pacientes (52,94%) relataram que já foram diagnosticadas ou possuem alguma alteração no colo do útero, incluindo NIC 1, NIC 2 e NIC 3, além de outras alterações, como inflamações. Adicionalmente, 52,94% não possuem ou não tem conhecimento de histórico

familiar de câncer. Estes resultados são importantes para a análise de cofatores ambientais e comportamentais que poderiam estar envolvidos no processo de infecção viral e possível desenvolvimento posterior de câncer.

A detecção do HPV foi realizado pela técnica de PCR, que tem sido bastante utilizada no diagnóstico molecular viral, tendo se mostrado como uma metodologia bastante sensível. Por outro lado, sem as devidas padronizações, a possibilidade da ocorrência de falsos resultados (positivos ou negativos) é grande. Por isso, foi realizado um grande controle das condições experimentais, além de ser testada a viabilidade do DNA extraído antes de iniciar o processo de diagnóstico.

A primeira etapa do diagnóstico das mulheres do Grupo 1 consistiu na utilização de iniciadores genéricos para detecção geral de seqüências de DNA viral. O par de iniciadores utilizado, MY11/MY09, foi originalmente desenhado para detectar tipos de HPV de mucosa (MANOS et al., 1989), amplificando o gene L1 da maioria dos tipos de HPV. Como resultado, 32,35% das amostras foram positivas quando submetidas à amplificação com este par de iniciadores.

Uma segunda etapa de diagnóstico utilizou a mesma técnica de PCR convencional, porém com os iniciadores GP5+/GP6+. Amostras negativas para MY11/MY09, foram submetidas à amplificação com GP5+/GP6+ e foi possível observar 10 amostras positivas nas amostras (29,41%), antes consideradas negativas para HPV.

Para detecção de HPV, também se utiliza a técnica de *nested*-PCR que inclui o uso de iniciadores degenerados MY09/MY11 e consenso GP5+/GP6+ para amplificar a região da L1 (LIMA JÚNIOR et al., 2011). Então, no presente estudo, foi realizada uma terceira etapa de detecção com a utilização desta técnica. Foi possível verificar 5 amostras positivas antes não detectadas apenas com o uso dos iniciadores MY ou GP+. Isto demonstra a complementariedade das técnicas, comprovando o que já foi descrito em estudos anteriores sobre a necessidade de mais de um sistema de detecção viral (CARVALHO et al., 2010; LIMA JÚNIOR et al., 2011; LIN et al., 2008; MAFRA, 2012; NICOL et al., 2010).

As análises de tipagem viral foram realizadas com iniciadores específicos para os tipos HPV-16 e HPV-18. Embora trabalhos utilizem o método de RFLP proposto por Bernard et al. (1994) para identificar o tipo viral a partir do produto amplificado por PCR com iniciadores genéricos (DELUCA et al., 2013; MIRANDA et al., 2012), o direcionamento para dois tipos virais no presente estudo foi devido a

evidências de que, no Brasil, o HPV-16 é o vírus mais prevalente em todas as regiões, assim como o HPV-18 é detectado com alta frequência na população. (BALDEZ DA SILVA et al., 2009; BRITO et al., 2002; PEREIRA et al., 2007; RABELO-SANTOS et al., 2003). Estes dados foram corroborados no presente estudo onde, das 21 mulheres positivas para HPV-16 e/ou HPV-18, o tipo mais frequente encontrado foi o HPV-16 (76,19%), enquanto que o HPV-18 foi detectado em 57,14%.

Além disso, dentre as mulheres positivas para o HPV, 15 possuem ou já foram diagnosticadas com algum tipo de alteração no colo do útero (mancha, área negativa, NICs), incluindo 4 positivas para HPV-16 e 3 para HPV-18. Waggoner (2003) descreve que, entre os tipos de alto risco, o mais frequente é o HPV-16, responsável por cerca de 60 a 70% dos casos de carcinoma de cérvix associados a vírus. Segundo Wentzensen e Klug (2008), aproximadamente, 70% dos carcinomas são positivos para HPV-16 e -18.

De forma geral, no presente trabalho, foi possível detectar o HPV em 29 das 34 amostras analisadas. Os dados da presença viral foram relacionados às variáveis demográficas, comportamentais e clínicas das pacientes para verificação de possíveis cofatores. Pelo Teste Exato de Fisher, não foi encontrada associação significativa do HPV com as variáveis estudadas. Isto pode ter ocorrido diante do número amostral reduzido. O aumento deste número é imprescindível para tais dados estatísticos. Estudos realizados no Brasil, descrevem associação significativa entre a presença viral e a escolaridade, afirmando uma maior frequência viral em mulheres analfabetas ou com ensino primário (MIRANDA, 2009; MAFRA, 2012).

O desenvolvimento do câncer cervical necessita de infecções persistentes de HPVs de alto risco. A minoria das mulheres infectadas por estes tipos, no entanto, desenvolvem câncer de colo de útero (LOUVANTO et al., 2010; ZUR HAUSEN, 2009). Entre as mulheres analisadas no presente estudo e diagnosticadas com os HPVs de alto risco 16 e 18, nenhuma apresentava câncer cervical no momento da coleta.

Levando-se em consideração que o HPV já foi detectado em mucosa cervical normal (MIRANDA et al., 2010), é de extrema importância testes moleculares de detecção viral em atendimento de rotina nos postos de saúde e hospitais. Deste modo, os médicos podem se antecipar ao possível aparecimento de alterações celulares ou lesões cervicais, tomando providências para evitar o aparecimento dos

mesmos, visto o envolvimento de cofatores ambientais com o desenvolvimento de lesões na cérvix uterina.

Sabe-se que o HPV está relacionado desde a formação de verrugas até o câncer de colo de útero e, apesar da aceitação de seu papel no câncer, a presença de HPV não é suficiente para a transformação maligna completa. Uma série de cofatores podem estar envolvidos no processo carcinogênico (MIRANDA, 2010).

Já a detecção de HPV realizada em sangue periférico objetivou verificar a presença viral neste tecido, uma vez que estudos descrevem que esta seja uma via de disseminação viral que possibilitaria a infecção em células epiteliais de outros órgãos (DINIZ et al., 2011; STOCCO DOS SANTOS et al., 1993). A presença confirmada de HPV nas amostras trabalhadas pode sugerir tal disseminação uma vez que o vírus também foi detectado em outros tecidos.

O HPV já foi detectado em sangue confirmando esta hipótese (BODAGHI et al., 2005; CHEN et al., 2009; DONG et al., 2002; HO et al., 2005). Kay et al. (2002) detectaram sequências de HPV-16 e HPV-18 em tecido sanguíneo de pacientes com câncer cervical. Estes autores sugerem que o diagnóstico de HPV pelo sangue só é possível em mulheres com neoplasias mais avançadas. Este fato pode estar ligado à carga viral circulante, podendo estar nem nível mais alto em mulheres com câncer cervical. Apesar de estudos sugerirem a transmissão viral por sexo oral em pacientes com câncer de boca (CHUNG; BAGHERI; D'SOUZA, 2013), não se pode descartar a ideia de transmissão via sangue de um sítio de infecção primário para um sítio secundário num mesmo indivíduo.

Sequências de papilomavírus bovino (BPV), considerado um modelo para estudos em HPV, também já foram detectadas em sangue periférico, sugerindo disseminação viral por este tecido (DINIZ et al., 2009).

Adicionalmente, neste trabalho, sequências de DNA foram detectadas em culturas de linfócitos confirmando a presença do vírus nestas células. Os linfócitos têm sido propostos como sítios de latência viral de HPV e BPV (Campo, 2003). Diniz et al. (2009), estudando BPV, detectaram sequências virais em cultura, sugerindo a replicação do epissomo viral durante a divisão celular em sistema *in vitro*. Assim, existiria a possibilidade de aumento do número de cópias virais em sistema de cultura celular, visto que há um aumento do número de linfócitos. Ainda em relação ao BPV, Stocco dos Santos et al. (1998) e Melo et al. (2011) detectaram aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos de bovinos e sugerem a

possibilidade de linfócitos serem sítios para latência viral. Porém a literatura pré-existente ainda não demonstra uma confirmação sobre a atividade viral neste sistema. Segundo de Villiers et al. (2004), existe uma dificuldade de encontrar um sistema de cultura celular apropriado para propagar os PVs e este fato tem dificultado o progresso no estudo das funções virais, limitando o estabelecimento da taxonomia baseada nas propriedades biológicas. O estudo aqui realizado corrobora a hipótese da importância do linfócito como célula mantenedora de HPVs, diante da detecção de sequências do genoma viral em cultura.

No processo carcinogênico, a instabilidade genômica é tida como o primeiro dos múltiplos eventos da evolução neoplásica. O Ensaio Cometa (EC) é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar danos e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Esta técnica tem sido bastante utilizada na análise da presença de HPV em pacientes fumantes, no estudo da apoptose celular induzida pelo vírus (CALINISAN et al., 2002; CONNELLY et al., 2001; MOKTAR et al., 2009), entre outros. Para o câncer cervical, o ensaio cometa tem sido bastante utilizado na verificação da instabilidade genômica em mulheres com neoplasia cervical (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2012).

No presente estudo, foi verificado se existe instabilidade genômica na presença de HPV em sangue periférico, cultura de linfócitos e em material cervical de mulheres atendidas pelo Sistema Único de Saúde em Recife/PE. Para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos independentes, foi realizado o teste de variância não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para tanto, foram feitas comparações entre os *scores* dos diferentes intervalos da cultura de linfócitos e das células cervicais. Para as pacientes HPV-positivas não se obteve diferença estatística significativa entre os grupos ($H=2,0994$ e $p= 0,5520$). Os dados indicam, portanto, efeitos clastogênicos semelhantes em sangue periférico, linfócitos cultivados *in vitro* e células cervicais, demonstrando níveis de clastogenicidade semelhantes. Este fato sugere que o sangue pode ser uma via de transmissão e um sítio passível de infecção, uma vez que possui semelhança nos níveis de clastogenicidade de células cervicais com altos *scores* nestas pacientes portadoras do vírus. Sugere-se a importância da competência do HPV em infectar linfócitos.

Para o vírus entrar na célula hospedeira, é necessário que proteínas de seu capsídeo interajam com receptores conservados da membrana. (RODEN et al., 1994; SAPP; DAY, 2009). Os receptores primários glicosaminoglicanos de heparam

sulfato estão presentes na membrana celular e agem na interação do Papilomavírus com a célula hospedeira (SHAFTI-KERAMATI et al., 2003).

Levando-se em consideração que os linfócitos T expressam estes proteoglicanos (REIJMERS; SPAARGAREN, 2013) e que estes, por sua vez, interagem com a L1 do capsídeo de diversos tipos de HPV (ROMMEL et al., 2005), potencializando a entrada de partículas virais na célula, é possível sugerir que o HPV esteja fazendo dos linfócitos de sangue periférico um sítio de infecção. Entretanto, alguns estudos demonstram que o processo de infecção celular pelo HPV é mais complexo e que pode depender de mais de um receptor na superfície celular facilitando a internalização viral (EVANDER et al., 1997)

Este fato pode ser suportado pela análise de clastogenicidade por EC realizado em cultura de linfócitos. Os grupos 0h, 24h e 48h foram analisados nas mulheres HPV-positivas, pelo teste de Mann-Whitney, comparando-as àquelas HPV-negativas. Diferenças estatísticas significativas entre amostras de cultura de linfócitos HPV-negativas e HPV-positivas foram evidenciadas ($p=0,0338$, $p=0,0079$ e $p=0,0022$, para C0h, C24h e C48h, respectivamente), permitindo sugerir que os danos clastogênicos são decorrentes da ação viral e não do período de incubação ou manipulação do material biológico. Este fato pode ser comprovado pela análise estatística ANOVA realizada nas amostras HPV-negativas, onde não se observou diferença significativa em linfócitos cultivados ($p=0,9774$)

Embora o teste de Kruskal-Wallis não tenha evidenciado diferenças significativas entre a clastogenicidade dos intervalos de cultura de 0h, 24h e 48h e de células cervicais, a reta de regressão fornece uma análise gráfica de um aumento do valor de *scores* ao longo do tempo em pacientes HPV-positivas quando comparadas às HPV-negativas, como demonstrado nas figuras 17 e 19. A reta de regressão para as pacientes HPV-positivas apresentou coeficiente de determinação (R^2)= 0,9313 e coeficiente de Pearson (R)= 0,9650, apontando uma correlação positiva entre o tempo de cultivo e danos no DNA. Já para as pacientes HPV-negativas, embora a regressão sugira um aumento do índice clastogênico em função do tempo, a regressão apresentou um baixo coeficiente de correção ($R=0,75$ e $R^2=0,8660$). Estes resultados sugerem um aumento de números de cópias virais ao longo do tempo. Diferenças estatísticas poderiam ser visualizadas se tivessem sido realizadas culturas com intervalos de tempo de 72h, por exemplo. Este dado sugere um aumento de danos em sistema *in vitro* na presença do vírus, enfatizando

a idéia de que o linfócito seja uma célula alvo para infecção por HPV, além de via de transmissão viral através da infiltração leucocitária para tecidos lesionados, nos quais o vírus completaria seu ciclo reprodutivo a partir das células da camada basal.

Hipóteses de que o linfócito seja um sítio de infecção foram levantadas por Diniz et al. (2009) e Melo et al. (2011), quando detectaram sequências de BPV e aberrações cromossômicas decorrentes da infecção por este vírus em linfócitos em cultura. Esta hipótese é apoiada por experimentos com BPV no grupo de pesquisa (CAMPOS et al., 2008; STOCCO DOS SANTOS et al., 1993; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998).

Considerando que, por mais de duas décadas, o BPV tem sido um modelo de estudo para Papilomavírus (STOCCO DOS SANTOS et al., 1993; STOCCO DOS SANTOS et al., 1998; WALTER-MOURA et al., 1988; YAGUIU, et al., 2008; ZHENG; BAKER, 2006), os resultados encontrados em nosso grupo, sugerem uma aumento de número de cópias de BPV em cultivo primário de células, além da expressão de suas proteínas *in vitro*.

Adicionalmente, Araldi et al. (2013), utilizando o ensaio cometa para verificar danos no material genético em sangue periférico de animais infectados por BPV, observaram que este vírus pode causar quebras na dupla fita do DNA de células nucleadas do sangue destes animais.

No EC realizado no presente estudo, a clastogenicidade evidencia quebras duplas e simples nas diferentes amostras analisadas. As quebras duplas são consideradas mais graves à célula, uma vez que não haveria fita molde remanescente disponível para o reparo do dano por polimerases específicas.

Por sua vez, estas mutações podem, ao longo do tempo, serem acumuladas gerando uma instabilidade genômica, que é o primeiro passo para o desenvolvimento carcinogênico (FENECH, 2000). O câncer cervical demora de 15 a 20 anos para se desenvolver. Adicionalmente, mutações estocásticas podem ser um fator envolvido no surgimento deste tumor. Considerando que eventos clastogênicos foram identificados em sangue periférico e células cervicais, também em mulheres com a mucosa cervical normal no presente estudo, a realização do ensaio cometa foi de grande importância, visto que indivíduos portadores do vírus podem acumular mutações estas ao longo dos anos.

O papel do HPV na patogênese do câncer cervical já vem sendo bastante estudado (TRUNK; WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2005) e agora

está sendo investigado sua relação com o retinoblastoma. As amostras de RB preservadas em parafina (provenientes de 5 crianças do segmento retrospectivo e 2 do segmento prospectivo) foram analisadas para a presença de HPV pela técnica de hibridização *in situ*, além de análises da expressão das proteínas virais por imunistoquímica.

Primeiramente, foi possível traçar um perfil de 20 crianças incluídas no Grupo 2, a partir de dados obtidos através dos prontuários. Estas pacientes foram atendidas na cidade do Recife residem na região metropolitana do Recife, interior do Estado de Pernambuco e em outros Estados. Pode-se observar um maior número de pacientes com idade entre 12 e 36 meses no momento do diagnóstico para retinoblastoma (75%), um maior número de indivíduos do sexo masculino (65%), com tumor unilateral (65%) e intraocular (65%).

Nas crianças com retinoblastoma do segmento prospectivo, não foi possível detectar o vírus com a utilização dos iniciadores MY09/MY11. Apenas com o uso de GP5+/GP6+, o HPV foi detectado nas amostras de cultura das duas pacientes e no tumor de apenas uma criança.

Estudos tem comprovado a presença do HPV em retinoblastoma (MOHAN et al., 2009; ORJUELA et al., 2000). No Brasil, Antoneli et al. (2011) demonstraram uma baixa frequência do vírus neste tipo de tumor (4,6%). Porém, Lima (2009), utilizando iniciadores MY09/MY11 e a técnica de *nested*-PCR com os iniciadores GP5/GP6, detectou HPV em 80,9% das amostras de retinoblastomas parafinadas analisadas, na cidade de Recife/PE. Este fato demonstra uma alta incidência viral nos casos deste tipo de tumor nesta cidade, foco do presente estudo.

No geral, os resultados atingidos pela utilização destes iniciadores genéricos foram diferenciados nas amostras biológicas (sangue periférico, cultura de linfócitos e material cervical/retinoblastoma), possivelmente pela baixa carga viral em muitas delas, o que será analisado posteriormente com a padronização da técnica de PCR tempo real para quantificação da carga viral, que já se encontra em andamento.

Nas crianças com retinoblastoma do segmento prospectivo foi observada apenas a presença do HPV-16 nas duas pacientes. Estes resultados corroboram estudos descritos na literatura que demonstram uma maior frequência deste tipo viral em tumores de retina (PALLAZI et al., 2003). Em contrapartida, outros autores descrevem detecção de HPVs de alto risco diferentes dos detectados no presente

estudo, além do HPV-18 detectado em apenas uma amostra analisada (ANE et al., 2011). Estudos ainda demonstram a associação de HPV tanto de baixo como de alto risco com retinoblastoma (MONTROYA-FUENTES et al., 2003; SHETTY et al., 2012).

Lima (2009), analisando amostras de retinoblastoma conservadas em parafina, detectou uma alta frequência do HPV (80,9%) em pacientes atendidos no Centro de Oncohematologia de Pernambuco-HUOC. Porém, não houve associação entre a presença viral e as variáveis: sexo, lateralidade, localização, estadiamento e a idade ao diagnóstico.

Alguns casos descritos no presente estudo evidenciam a imunomarcagem para proteínas virais e não hibridizam com a sonda utilizada, ou vice-versa, podendo existir duas explicações para este fato. A primeira seria devido a aspectos técnicos como a fixação em formol, processamento do tecido e qualidade da parafina, que poderiam interferir significativamente na preservação do DNA e de epítomos protéicos virais, visto que a maioria dos blocos de tumor utilizados poderiam não apresentar um padrão de qualidade ótimo para estudos de investigação científica. Estes fatores podem ser responsáveis por discrepâncias nos dados de presença viral, como sugerido por Shetty et al. (2012). A segunda hipótese seria a expressão temporal destas proteínas, fato já descrito para tecido epitelial, que poderia estar ocorrendo nestas amostras, não sendo possível marcar algumas proteínas em determinados estágios da doença.

A partir da realização da técnica de imunohistoquímica para verificação da presença de proteínas virais em amostras de retinoblastoma preservados em blocos de parafina, foi possível observar marcação para as proteínas conjugadas E1+E4 de HPV-16, da proteína L1 dos HPVs 1, 6, 11, 16, 18 e 31 e da proteína E6 de HPV-16 e 18 em diferentes regiões do tecido.

O HPV completa seu ciclo em células mais diferenciadas (TRUNK; WENTZENSEN; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2005). Stanley et al. (2012) indicam que expressão de genes estruturais é restrita aos queratinócitos, não existindo nenhuma evidência de genes virais sendo expressos em qualquer outra célula. Em contradição com a literatura que descreve o ciclo viral estritamente dependente da diferenciação das células nas camadas epiteliais, os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de proteínas virais pode não depender apenas da diferenciação dos queratinócitos. As marcações para estas proteínas foram

encontradas nas células tumorais, em diferentes camadas da retina, tecido epitelial da córnea e em células nervosas e endoteliais consituíntes do nervo óptico, além de marcações evidentes em infiltrados inflamatórios. Adicionalmente, os achados em sangue periférico de algumas crianças e nas mulheres envolvidas neste estudo apoiam esta hipótese.

Foi possível observar que o DNA do vírus está se mantendo em tecido com tumor avançado, chegando, em alguns casos, à invasão no nervo óptico com expressão de proteínas importantes na desregulação do ciclo celular. Jhonson et al. (2007) relatam que células de retinoblastoma são submetidas a uma considerada diferenciação neuronal em estados precoces. Portanto, segundo esses autores, a associação entre a presença do HPV e a diferenciação morfológica do tumor sugere um possível papel do HPV nos estágios precoces do desenvolvimento do RB. Considerando que o nervo óptico se origina de células embrionárias da retina, os resultados encontrados, tanto em pacientes com invasão tumoral no nervo óptico quanto naqueles sem invasão, apresentando expressão da proteína estrutural L1 e da oncoproteína E6 em feixes nervosos, são de grande importância na verificação da localização viral no desenvolvimento do tumor. A presença de HPV nestas células nervosas foi corroborada pela hibridização, onde foi possível detectar DNA de HPV.

Foi possível, ainda, detectar DNA do vírus e as proteínas L1 e E6 no tecido endotelial de vasos do nervo óptico, resultado ainda não relatado na literatura. Adicionalmente, através da técnica de PCR, detectou-se o vírus em sangue periférico destas pacientes. Estes achados podem sugerir uma dispersão viral via corrente sanguínea.

A coidentificação de DNA e a proteína L1 do HPV nas mesmas regiões do tecido ocular sugere este tecido como sítio de organização de partículas virais. Além disso, proteínas necessárias à replicação viral (E1^{E4}) foram detectadas em outras regiões do tecido o que pode indicar uma ação de replicação do DNA do vírus. A presença da proteína E6, também imunomarcada, indica uma ação transformante do HPV nas células, uma vez que esta oncoproteína pode se ligar e degradar a p53 via ubiquitinação. Mais estudos são necessários para identificação de outras proteínas, como L2 e E7, para verificação da possível formação completa da partícula viral e sua ação transformante nesta fase tumoral e nestes locais analisados.

Os resultados moleculares para os pacientes do segmento prospectivo e os resultados da imunomarcção de proteínas virais, associados aos dados de

hibridização *in situ* de crianças dos dois segmentos do Grupo 2, evidenciaram o HPV nestas amostras, seja por meio da detecção de seus genes, seja por meio das marcações de suas proteínas. O HPV já foi detectado em papilomas e carcinomas conjuntivos e em mucosa normal ocular (KARCIOGLU; ISSA, 1997; MÄNTYJÄRVI et al., 1989; MONTOYA-FUENTES et al., 2003; SJO et al., 2001). Além disso, sequências de DNA deste vírus também têm sido demonstradas em tumores frescos de retina (MOHAN et al., 2009; ORJUELA et al., 2000; PALAZZI et al., 2000). Na cidade do Recife, em amostras parafinadas, o HPV foi detectado, por técnicas moleculares, em 80,9% dos pacientes atendidos pelo Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, em Pernambuco (LIMA, 2009), em contradição com achados de outros autores que demonstram uma baixa frequência de HPV neste tipo de tumor (ANTONELI et al., 2011).

A possível forma de transmissão do HPV para a criança já vem sendo estudada por diversos autores. Bhuvaneswari et al. (2012) sugerem que esta transmissão se dê por transferência materna. Neste contexto, o HPV já foi detectado em sangue periférico de mulheres grávidas, em sangue do cordão umbilical de recém-nascidos (TSENG et al., 1992) e fluido amniótico (ARMBRUSTER-MORAES et al., 1994; XU et al., 1998). Tseng et al. (1992) evidenciaram a transmissão vertical do HPV da mãe para a criança, demonstrando que o vírus pode infectar o recém-nascido e desenvolver processos carcinogênicos como o retinoblastoma. Adicionalmente, o HPV já foi detectado infectando trofoblastos, que são células epiteliais da placenta, através das quais ocorrem as trocas de nutrientes. Esta infecção já foi relatada como causa de alguns abortos espontâneos (HERMONAT et al., 1998).

No caso de retinoblastomas, estudos demonstram incidências de HPV neste tipo de tumor de 4,6% a 69,7% (ANE et al., 2011; ANTONELLI et al., 2011; MOHAN et al., 2009; SHETTY et al., 2011). Sabendo que a origem da infecção por HPV de crianças com retinoblastomas pode ser por transmissão vertical (BHUVANESWARI et al., 2012), a diminuição da incidência do vírus nas mulheres pode acarretar uma diminuição desses casos de câncer ligados à infecção viral. Qualquer esforço que venha a diminuir casos de infecções, lesões e/ou cânceres cervicais, é de extrema importância na diminuição de casos de retinoblastomas esporádicos que envolvam o HPV. Da mesma forma que o câncer cervical, diminuições de casos de câncer de retina indiretamente pelo acompanhamento das mulheres, acarretam diminuições de

processos traumatizantes para as crianças em seu tratamento, que muitas vezes engloba o processo cirúrgico de enucleação, além de quimioterapia e radioterapia.

Mais estudos são necessários para investigar mais profundamente a relação do HPV e a atividade de seus oncogenes no desenvolvimento da progressão do retinoblastoma.

Os resultados obtidos através das amostras de sangue, material cervical e retinoblastoma são importantes para o entendimento da fisiopatogenia da doença, além de serem contributivos aos estudos direcionados a cidade de Recife, PE, cuja a incidência de câncer cervical é de 190 casos estimados para 2012 (INCA, 2012) e de retinoblastoma foram 8 casos entre os anos de 1997 e 2001 (INCA, 2008). Estes dados relatados sobre incidências de câncer cervical e retinoblastoma indicam a necessidade de estudos que visem ampliar o conhecimento sobre fatores envolvidos na etiopatogênese dessas doenças.

7 CONCLUSÕES

- A partir dos resultados de ensaio cometa, foi possível sugerir que o HPV utiliza a corrente sanguínea não só como via de circulação e eventual transmissão, mas também como sítio de infecção ativa, podendo ser internalizado pelos linfócitos e causar eventos clastogênicos nos mesmos;
- Sugere-se que os níveis de clastogenicidade estejam aumentando em cultura de linfócitos, uma vez que o HPV possivelmente esteja ativo *in vitro*, causando danos ao DNA da célula hospedeira;
- DNAs de HPVs de alto risco foram detectados em tumores de retina, além de três proteínas virais (E1^{E4}, E6 e L1). Estes dados ajudam a entender a temporalidade e especificidade de locais da expressão do HPV;
- Foram identificados possíveis novos sítios de infecção viral em tecido ocular pelas técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*: células endoteliais e células nervosas;
- A presença de sequências virais e expressão de proteínas denotam que possivelmente existe uma atividade viral em células tumorais e tecido adjacentes;
- Embora não significantes, as taxas de danos no DNA nas células sanguíneas e cervicais indicam uma necessidade de periodicidade de acompanhamento médico dos indivíduos clinicamente normais, porém portadores de HPV de alto risco, frente à possibilidade de acúmulo dessas mutações e desenvolvimento de lesões.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AGOSTI, J. M.; GOLDIE, S. J. Introducing HPV vaccine in developing countries key challenges and issues. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 19, p. 1908–1910, 2007.

ALAM, S. et al. The cigarette smoke carcinogen benzo pyrene enhances human papillomavirus synthesis. **J. Virol.**, v. 82, n. 2, p. 1053–1058, 2008.

ADVISORY, A. *Committee statement on humanpapillomavirus vaccine*. **Canada Communicable Disease Report**, v. 33, 2007.

ANAND, B. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus genotypes in retinoblastoma. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 95, n. 7, p. 1014–1018, 2011.

ANTONELI, C. B. G. **Retinoblastoma**: análise da evolução clínica de pacientes portadores de retinoblastoma submetidos a tratamento multidisciplinar. 1999. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ANTONELI, C. B. et al. Low prevalence of HPV in brazilian children with retinoblastoma. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 1, p. 115–118, 2011.

ANTONSSON, A. et al. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. **J. Virol.**, v. 74, n. 24, p. 11636–11641, 2000.

ARALDI, R. et al. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, 2013.

ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1755–1762, 2006.

ARMBRUSTER-MORAES, E. et al. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. **Gynecol. Oncol.**, v. 54, n. 2, p. 152–158, 1994.

ATKIN, N. B. Cytogenetics of carcinoma of the cervix uteri: a review. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 95, n. 1, p. 33–39, 1997.

AULT, K. A. Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types. **Gynecol. Oncol.**, v. 107, n. 2, p. S31–S33, 2007.

AYRES, M. et al. Programa bioestat 5.0. *Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Biomédicas*. **Sociedade Civil Mamirauá, Belém**, 2005.

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

AZQUETA, A. et al. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutat. Res.**, v. 724, n. 1, p. 41–45, 2011.

BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intraepiteliais do colo uterino. **Rev. Bras. Ginecol. Obst.**, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2004.

BALDEZ DA SILVA, M.F. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 4, p. 1437-1443. 2009.

BAKER, C. C.; HOWLEY, P. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. **The EMBO Journal**, v. 6, n. 4, p. 1027-1035, 1987.

BARKSDALE, S.; BAKER, C. C. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 p2443 and late promoters. **J. Virol.**, v. 67, n. 9, p. 5605–5616, 1993.

BENNETT, M. D. et al. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from *bettongia penicillata*. **J. Virol.**, v. 84, n. 10, p. 5448–5453, 2010.

BERNARD, H. U. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J. Infect. Dis.**, v. 170, n. 5, p. 1077–1085, 1994.

BERNARD, H. U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. **Antivir. Th.**, v. 7, n. 4, p. 219–237, 2002.

BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.

BIERKENS, M. et al. HPV type-related chromosomal profiles in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 36, 2012.

BOCCARDO, E. HPV mediated genome instability: At the roots of cervical carcinogenesis. **Cytogenet. Genome. Res.**, v. 128, n. 1-3, p. 57–65, 2010.

BODAGHI, S. et al. Could human papillomaviruses be spread through blood? **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, 2005.

BONTKES, H. J. et al. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper

lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. **J. Gen. Virol.**, v. 80, n. 9, p. 2453–2459, 1999.

BORSATTO, A. Z.; VIDAL, M. L. B.; ROCHA, R. C. N. P. Vacina contra o HPV e a prevenção do câncer do colo do útero: Subsídios para a prática. **Ver. Bras. Cancerol.**, v. 57, n. 1, p. 67–74, 2011.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Vet Res.**, v. 39, n. 5, p. 1, 2008.

BOSCOLO-RIZZO, P. et al. New insights into human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma. **Acta Otorhinolaryngol. Ital.**, v. 33, p. 77–87, 2013.

BOULET, G. et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, n. 11, p. 2006–2011, 2007.

BOULET, G. A. et al. Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 4, p. 810–817, 2008.

BOUVARD, V. et al. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. **Virology**, v. 203, n. 1, p. 73–80, 1994.

BRITO, E.; MARTINS, S.; MENEZES, R. Human papillomaviruses in amerindian women from brazilian amazonia. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 3, p. 485–489, 2002.

BROADDUS, E.; TOPHAM, A.; SINGH, A. D. Survival with retinoblastoma in the USA: 1975–2004. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 93, n. 1, p. 24–27, 2009.

BUITRAGO-PÉREZ, Á. et al. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: PCR, p53 and gene expression profiling. **Curr. Genom.**, v. 10, n. 1, p. 26–34, 2009.

CALINISAN, J. H. et al. Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 19, n. 3, p. 132–136, 2002.

CAMPO, M. Persistent infection by bovine papillomavirus. **Persistent Viral Infections. Wiley, Indianápolis.** p. 503–516, 1998.

CAMPO, M. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 3–14, 2003.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons. **Papillomavirus Res: From Natural History to Vaccines and Beyond**, p. 373–387, 2006.

CAMPOS, et al. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? **Genet. Mol. Res.**, v. 7, n. 4, p. 1119-1126, 2008.

CARESTIATO, F. N. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 5, p. 331–336, 2006.

CARPAGNANO, G. et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. **Br. J. Cancer.**, v. 105, n. 8, p. 1183–1190, 2011.

CARVALHO, J.; OYAKAWA, N. **Consenso brasileiro de HPV**. São Paulo: BG Cultural, v. 1, 2000.

CARVALHO, C. D. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 82–84, 2003. Suppl. 1.

CARVALHO, N. D. O. et al. Comparison of HPV genotyping by type specific PCR and sequencing. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, v. 105, n. 1, p. 73–78, 2010.

CASTELLSAGUE, X.; BOSCH, F. X.; MUNOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Res.**, v. 89, n. 2, p. 191–199, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. **JNCI Monographs**, v. 2003, n. 31, p. 20–28, 2003.

CASTRO, T. P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 72, n. 2, p. 272–282, 2006.

CHAN, S. Y. et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. **J. Virol.**, v. 69, n. 5, p. 3074–3083, 1995.

CHEN, A. C. H. et al. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy australian male blood donors. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 10, p. 1792–1796, 2009.

CHOI, S. W.; MASON, J. B. Folate and colorectal carcinogenesis: is DNA repair the missing link? **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 2013–2015, 1998.

CHOY, K. W. et al. Loss of heterozygosity and mutations are the major mechanisms of Rb1 gene inactivation in chinese with sporadic retinoblastoma. **Hum. Mut.**, v. 20, n. 5, p. 408–408, 2002.

CLAUS, M. P. et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in brazilian cattle herds. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. spe, p. 93–98, 2009.

CONNELLY, D. A. Human sperm deoxyribonucleic acid fragmentation by specific types of papillomavirus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 184, n. 6, p. 1068–1070, 2001.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. et al. Association between human papilloma virus-type infections with micronuclei frequencies. **Prague Med. Rep.**, v. 111, n. 1, p. 35–41, 2010.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. et al. Evaluation of dna single and double strand breaks in women with cer- vical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **Biomed. Res. Int.**, v. 2012, 2012.

COX, T.; CUZICK, J. HPV DNA testing in cervical cancer screening: from evidence to policies. **Gynecol. Oncol.**, v. 103, n. 1, p. 8–11, 2006.

DAWAR, M.; DEEKS, S.; DOBSON, S. Human papillomavirus vaccines launch a new era in cervical cancer prevention. **CMAJ.**, v. 177, n. 5, p. 456–461, 2007.

DAY, P. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Papillomaviruses infect cells via a clathrin dependent pathway. **Virology**, v. 307, n. 1, p. 1–11, 2003.

DE GRUIJL, T. et al. Differences in cytokine mrna profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 3, p. 490–497, 1999.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DELUCA, G. et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in women with cervical alterations from north argentina. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 31, n. 2, p. 138–141, 2013.

DEMARINI, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco sm condensate: a review. **Mutation Res. Rev.**, v. 567, n. 2, p. 447–474, 2004.

DINIZ, N. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short term lymphocyte cultures from dairy cattle in pernambuco, Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 8, n. 4, p. 1474–1480, 2009.

DONG, S. M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. **Cancer Epidemiol. Biom. Prev.**, v. 11, n. 1, p. 3–6, 2002.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J. Clin. Virol.**, v. 32, p. 7–15, 2005.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Science**, v. 110, p. 525–541, 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 109, n. 2, p. 157–162, 2004.

DUNNE, E. F.; MARKOWITZ, L. E. Genital human papillomavirus infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 5, p. 624–629, 2006.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, Washington, v. 243, n. 4893, p. 934–937, 1989.

EVANDER, M. et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **J. Virol.**, v. 71, n. 3, p. 2449–2456, 1997.

FABIANI, R. et al. G. Genotoxicity of alkene epoxides in human peripheral blood mononuclear cells and HL60 leukaemia cells evaluated with the comet assay. **Mutat. Res.**, v. 747, n. 1, p. 1–6, 2012.

FAY, A. et al. The positively charged termini of I2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and dna binding. **J. Virol.**, v. 78, n. 24, p. 13447–13454, 2004.

FENECH M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 445, p. 81–85, 2000.

FORSLUND, O. et al. broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **J. Gen. Virol.**, v. 80, n. 9, p. 2437–2443, 1999.

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 46–55, 2004.

FRIEDMAN, D. L. et al. Chemoreduction and local ophthalmic therapy for intraocular retinoblastoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, n. 1, p. 12–12, 2000.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **J. Virol. Meth.**, v. 122, n. 1, p. 87–93, 2004.

GARLAND, S. M. et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 19, p. 1928–1943, 2007.

GOTTSCHLING, M. et al. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 5, p. 1242–1258, 2007.

GRASSMANN, K. et al. Tion of a differentiation inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. **J. virol.**, v. 70, n. 4, p. 2339–2349, 1996.

GREEN, K. L.; GASTON, K. Development of a topical protein therapeutic for human papillomavirus and associated cancers. **Bio. Drugs.**, v. 20, n. 4, p. 209–218, 2006.

GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Infecção por papilomavirus humano**: atlas clínico de HPV. Porto Alegre: Editora Artmed, 1999.

HAGENSEE, M. et al. Three-dimensional structure of vaccinia virus produced human papillomavirus type 1 capsids. **J. Virol.**, v. 68, n. 7, p. 4503–4505, 1994.

HALBERT, C.; DEMERS, G.; GALLOWAY, D. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J. Virol.**, v. 65, n. 1, p. 473–478, 1991.

HAM, J. et al. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 16, p. 440–444, 1991.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, n. 10, p. 733–744, 2003.

HECK, D. V. et al. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, n. 10, p. 4442–4446, 1992.

HELIN, K.; HARLOW, E.; FATTAEY, A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 10, p. 6501–6508, 1993.

HELLNER, K.; MÜNGER, K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 13, p. 1785–1794, 2011.

HERBST, L. H. et al. Genomic characterization of two novel reptilian papillomaviruses, chelonid mydas papillomavirus 1 and caretta caretta papillomavirus 1. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 131–135, 2009.

HERMONAT, P. L. et al. Trophoblasts are the preferential target for human papilloma virus infection in spontaneously aborted products of conception. **Hum. Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 170–174, 1998.

HO, G. Y. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 7, p. 423–428, 1998.

HO, C.-M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. **Gynecol. Oncol.**,

v. 99, n. 3, p. 615–621, 2005.

HOWLEY, P.; LOWY. Papillomaviruses and their replication. **Fields Virolog**, D. **M.Knipe E P. M. Howley**, v. 65, p. 2197–2229, 2001.

HU, L.; CERESA, B. P. Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell cell fusion. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 135–143, 2009.

HUACHACA, N. S. M. **Teste do cometa e teste de germinação na detecção do tratamento de alimentos com a radiação ionizante**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

HUDELIST, G. et al. Physical state and expres- sion of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynec. Oncol.**, v. 92, n. 3, p. 873–880, 2004.

HUSNJAK, K. et al. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **J. Virol. Methods.**, v. 88, n. 2, p. 125–134, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência de câncer no Brasil**. 2012. Disponível em: <www.inca.gov.br >. Acesso em: 19 jun. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer na criança e no adolescente no brasil. dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. 2008. Disponível em: <www.inca.gov.br >. Acesso em: 10 jul. 2013.

JOHNSON, M. et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6–E7 transcription in cervical carcinomas and normal cervical epithelium using the polymerase chain reaction. **J. Gen. Virol.**, v. 71, n. 7, p. 1473–1479, 1990.

JOHNSON, D. A. et al. Neuronal differentiation and synaptogenesis in retinoblastoma. **Cancer Res.**, v. 67, n. 6, p. 2701–2711, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAMSKI, J. J.; SINGH, A. Tumors of the retina. In: KAMSKI, J. J. **Clinical ophthalmology: a systematic approach**. 3rd ed. Oxford, 1994.

KANESHIMA, E. N. et al. Aplicação do método PCR- RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no LEPAC, universidade estadual de maringá. **Acta. Scientiarum. Health Science**, v. 23, p. 731–737, 2008.

KARCIOGLU, Z. A.; ISSA, T. M. Human papilloma virus in neoplastic and non-neoplastic conditions of the external eye. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 81, n. 7, p. 595–598, 1997.

KAY, P.; MEEHAN, K.; WILLIAMSON, A.-L. The use of nested polymerase chain

reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy number of viral DNA. **J. Virol. Methods**, v. 105, n. 1, p. 159–170, 2002.

KIYONO, T. et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, London, v. 396, n. 6706, p. 84–88, 1998.

KJÆR, S. K. et al. Long term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 102, n. 19, p. 1478–1488, 2010.

KOYAMATSU, Y. et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. **Gynecol. Oncol.**, v. 90, n. 3, p. 547–551, 2003.

KRAUS, I. et al. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 7, p. 1407–1413, 2004.

KRISTIANSEN, E.; JENKINS, A.; HOLM, R. Coexistence of episomal and integrated HPV16 DNA in squamous cell carcinoma of the cervix. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, n. 3, p. 253–256, 1994.

KURMAN, R. et al. Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 140, n. 8, p. 931–935, 1981.

LAGUNAS-MARTINEZ, A.; MADRID-MARINA, V.; GARIGLIO, P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. **Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer**, v. 1805, n. 1, p. 6–16, 2010.

LANCELLOTTI, C. et al. Diagnóstico laboratorial. In: CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. **I Consenso Brasileiro do HPV**. São Paulo: BG Cultural, 2000. v. 4, p. 45–60.

LANGIE, S. A. et al. Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: a comet-based in vitro repair assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 461–471, 2011.

LEAL-GARZA, C. H. et al. Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer **Mutat. Res. Genetic. Toxicol. Environ. Mutag.**, v. 515, n. 1, p. 57–62, 2002.

LIMA, E. **Estudo de fatores de suscetibilidade e associação com o papiloma vírus humano (HPV) em pacientes com retinoblastoma (Rb) do Nordeste do Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

LIMA JÚNIOR, S. F. D. et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes:

Comparison between three detection methods in patients of Pernambuco, Brazil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 33, n. 10, p. 315–320, 2011.

LIN, H. P. et al. Method for testing for human papillomavirus infection in patients with cervical intraepithelial disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 366–368, 2004.

LIN, C. Y. et al. Human papillomavirus typing with a polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. **J. Clin. Virol.**, v. 42, n. 4, p. 361–367, 2008.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 2, p. 362–372, 2004.

LOUVANTO, K. et al. Genotype-specific persistence of genital human papillomavirus (hpv) infections in women followed for 6 years in the finnish family hpv study. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n. 3, p. 436–444, 2010.

LUMBROSO, L. et al. DESJARDINS, L. Chemothermotherapy in the management of retinoblastoma. **Ophthalmology**, v. 109, n. 6, p. 1130–1136, 2002.

MACKAY, C. J.; ABRAMSON, D. H.; ELLSWORTH, R. M. Metastatic patterns of retinoblastoma. **Arch. Ophthalmol.**, v. 102, n. 3, p. 391–396, 1984.

MAFRA, M. F. **Estudo da prevalência e de cofatores associados à infecção pelo papilomavírus humano através da detecção e genotipagem de amostras clínicas de mulheres atendidas no sistema público de saúde de Pernambuco.** 2012. Tese (Doutorado) - Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

MANOS, M. et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, n. 17, p. 209–214, 1989.

MANSUR, C. Molecular mechanisms of HPV-associated oncogenesis. In: STERLING, J. C.; TYING, S. K. (Org.) **Human papillomaviruses clinical and scientific advances.** 2001.

MÄNTYJÄRVI, M. et al. Detection of human papillomavirus type 11 dna in a conjunctival squamous cell papilloma by in situ hybridization with biotinylated probes. **Acta Ophthalmol.**, v. 67, n. 4, p. 425–429, 1989.

MATEU, E. et al. Genetics of retinoblastoma: a study. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 95, n. 1, p. 40–50, 1997.

MATSUMOTO, K. et al. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. **Cancer Science**, v. 101, n. 9, p. 2065–2073, 2010.

MAYO, M. Changes to virus taxonomy 2004. **Arch. Virol.**, v. 150, n. 1, p. 189–198, 2005.

MELO, T. C. et al. Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by

papillomatosis. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 9, n. 4, p. 269–274, 2011.

MESPLÈDE, T. et al. p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. **J. Virol.**, v. 86, n. 1, p. 94–107, 2012.

MICHL, P. et al. Human papillomavirus in the etiology of head and neck carcinomas. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v. 154, n. 1, p. 9–12, 2010.

MIRANDA, P. et al. Human papillomavirus infection in brazilian women with normal cervical cytology. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n. 2, p. 1752, 2012.

MOHAN, A. et al. Detection of human papillomavirus dna in retinoblastoma samples: a preliminary study. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 31, n. 1, p. 8–13, 2009.

MOKTAR, A. et al. Cigarette smoke-induced dna damage and repair detected by the comet assay in hpv-transformed cervical cells. **Int. J. Oncol.**, v. 35, n. 6, p. 1297–1304, 2009.

MOLDEN, T. et al. Predicting cin2+ when detecting hpv mRNA and dna by pretest hpv-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ascus or lsil pap smear. **Int. J. Cancer. Suppl.**, v. 114, n. 6, p. 973–976, 2005.

MONTOYA-FUENTES, H. et al. Identification of dna sequences and viral proteins of 6 human papillomavirus types in retinoblastoma tissue. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 3C, p. 2853–2862, 2003.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Can.**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

MOORE, R. A. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in 5,000 british columbia women implications for vaccination. **Cancer Causes Control.**, v. 20, n. 8, p. 1387–1396, 2009.

MÜNGER, K. et al. Complex formation of human papillomavirus e7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 13, p. 4099–4105, 1989.

MÜNGER, K. et al. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J. Virol.**, v. 63, n. 10, p. 4417–4421, 1989.

MUNOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.

MUNOZ, N. et al. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1–S10, 2006.

MUNOZ, M. et al. Human papillomavirus detection from human immunodeficiency virus-infected colombian women's paired urine and cervical samples. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. 565–569, 2013.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Vet. Dermatol.**, v. 19, n. 5, p. 243–254, 2008.

NICOL, A. F.; NUOVO, G. J.; DILLNER, J. A summary of the 25th international papillomavirus conference 2009: Vaccines, screening, epidemiology and therapeutics. **J. Clin. Virol.**, v. 47, n. 3, p. 208–215, 2010.

NICOLAIDOU, E.; KATSAMBAS, A. D. The burden of human papillomavirus infections and the expected impact of the new vaccines. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 6, n. 4, p. 475–477, 2007.

OLAHARSKI, A. J. et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, p. 337–343, 2006.

ORJUELA, M. et al. Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. **Clin. Can. Res.**, v. 6, n.10, p. 4010–4016, 2000.

ORJUELA, M. A. et al. Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 6, p. 1433–1440, 2005.

PALAZZI, M. et al. Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma. **Acta Ophthalmol. Scand. Suppl.**, v. 81, n. 4, p. 396–398, 2003.

PEH, W. L. et al. Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease. **J. Virol.**, v. 76, n. 20, p. 10401–10416, 2002.

PEITSARO, P.; JOHANSSON, B.; SYRJÄNEN, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time pcr technique. **J. Clin. Microbial.**, v. 40, n. 3, p. 886–891, 2002.

PELKMANS, L.; HELENIUS, A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 414–422, 2003.

PEREIRA, C. et al. Human papillomavirus prevalence and predictors for cervical cancer among high-risk women from Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Gynecol. Cancer.**, v. 17, n. 3, p. 651–660, 2007.

PINTO, Á. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. HPV cofactors in cervical carcinogenesis.

Rev. Assoc. Med. Bras., v. 48, n. 1, p. 73–78, 2002.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D. M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Inter. J. Cancer**, v. 97, n. 1, p. 72–81, 2002.

PIYATHILAKE, C. J. et al. Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. **Cancer Res.**, v.64, n. 23, p. 8788–8793, 2004.

PIYATHILAKE, C. J. et al. Lower red blood cell folate enhances the hpv-16–associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. **Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 203–210, 2007.

POPPE, W.; et al. Langerhans' cells and I1 antigen expression in normal and abnormal squamous epithelium of the cervical transformation zone. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 41, n. 3, p. 207–213, 1996.

RABELO-SANTOS, S. et al. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia iii and invasive cervical cancer from goiânia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181–184, 2003.

RAMOS-VARA, J. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet. Pathol.**, v. 42, n. 4, p. 405–426, 2005.

RAZEK, A.; ELKHAMARY, S. MRI of retinoblastoma. **Br. J. Radiol.**, v. 84, n. 1005, p. 775–784, 2011.

RECOUSO, R. et al. Clastogenic effect of bracken fern (pteridium aquilinum v. arachnoideum) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 22–29, 2003.

REESE, A. B. **Tumors of the eye**. 3rd ed. Maryland: Harper & Row, 1976. p. 90–124.

REIJMERS, R. M.; SPAARGAREN, M.; PALS, S. T. Heparan sulfate proteoglycans in the control of b cell development and the pathogenesis of multiple myeloma. **FEBS Journal**, v. 280, p. 2180–2193, 2013.

RIBEIRO, K. D. C. B.; ANTONELI, C. B. G. Trends in eye cancer mortality among children in Brazil, 1980–2002. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 48, n. 3, p. 296–305, 2007.

RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 10, n. 4, p. 748–784, 1967.

RODEN, R. et al Interaction of papillomaviruses with the cell surface. **J. Virol.**, v. 68, n.11, p. 7260–7266, 1994.

ROMANCZUK, H.; THIERRY, F.; HOWLEY, P. Mutational analysis of cis elements involved in e2 modulation of human papillomavirus type 16 p97 and type 18 p105 promoters. **J. Virol.**, v. 64, n. 6, p. 2849–2859, 1990.

ROMMEL, O. et al. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact hpv l1 assemblies: Basis for a virus-like particle elisa. **J. Med. Virol.**, v. 75, n. 1, p. 114–121, 2005.

ROUSSEAU, M.-N. D. et al. Viral load and genomic integration of hpv 16 in cervical samples from hiv-1-infected and uninfected women in burkina faso. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 6, p. 766–770, 2007.

SACHDEVA, U. M.; O'BRIEN, J. M. Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 2, p. 425–434, 2012.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. C. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **J. E. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 16, n. 3, p. 231–240, 2002.

SAPP, M.; DAY, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma-and papillomaviruses. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 400–409, 2009.

SCHIFFMAN, M.; et al. Comparison of southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus dna. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 3, p. 573–577, 1991.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S. K. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. **JNCI Monographs**, v. 2003, n. 31, p. 14–19, 2003.

SCHIFFMAN, M. et al. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. **J. Infect. Dis.**, v. 195, n. 11, p. 1582–1589, 2007.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, 2007.

SCHLECHT, N. F. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, v. 286, n. 24, p. 3106–3114, 2001.

SCHLECHT, N. F. et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 103, n. 4, p. 519–524, 2003.

SCHWIMMER, C. J.; PRAYSON, R. A. Clinicopathologic study of retinoblastoma including mib-1, p53, and CD99 immunohistochemistry. **Ann Diag. Pathol.**, v. 5, n. 3,

p. 148–154, 2001.

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 1–6, 2009.

SHETTY, O. A. et al. Evidence for the presence of high risk human papillomavirus in retinoblastoma tissue from nonfamilial retinoblastoma in developing countries. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 58, n. 2, p. 185–190, 2012.

SHIELDS, C. L. et al. Optic nerve invasion of retinoblastoma. metastatic potential and clinical risk factors. **Cancer**, v. 73, n. 3, p. 692–698, 1994.

SHIMADA, T. et al. Human papillomavirus dna in plasma of patients with hpv16 dna-positive uterine cervical cancer. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 40, n. 5, p. 420–424, 2010.

SIGAROODI, A. et al. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of iran. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 2012, 2012.

SILVEIRA, S. O. **Orientação para práticas de laboratório**. Universidade de Santa Maria, 2006. 60 p.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SJÖ, N. C. et al. Human papillomavirus in conjunctival papilloma. **Brit. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 7, p. 785–787, 2001.

SMITH, E. M. et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 6, p. 449–455, 2004.

SMITH, J. S. et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 121, n. 3, p. 621–632, 2007.

SMOTKIN, D.; WETTSTEIN, F. O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. 13, p. 4680–4684, 1986.

SNIJDERS, P. J. et al. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. **J. Gen. Virol.**, v. 71, n. 1, p. 173–181, 1990.

SOARES, R. C. et al. Detection of hpv dna and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of brazilian patients. **J. App. Oral Scie.**, v. 16, n. 5, p. 340–344, 2008.

SOTLAR, K. et al. Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. **Gynecol. Oncol.**, v. 69, n. 2, p. 114–121, 1998.

SOTLAR, K. et al. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex pcr. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 7, p. 3176–3184, 2004.

SOUSA, T. **Papilomavírus humano e a detecção do dna viral no carcinoma epi- dermóide da cavidade oral**: revisão da literatura. 2001. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2001.

SOUZA, N.; MELO, V.; CASTRO, L. Diagnóstico da infecção pelo hpv em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. **RBGO**, v. 23, n.6, 2001.

SOUZA FILHO, J. P. D. et al. Histopathologic findings in retinoblastoma. **Arq. Bras. Oftal.**, v. 68, n. 3, p. 327–331, 2005.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24, p. S16–S22, 2006.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clin. Microbial. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.

STAUFFER, Y. et al. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. **J. Mol. Biol.**, v. 283, n. 3, p. 529–536, 1998.

STOCCO DOS SANTOS, R. C. et al. Chromosome aberrations in cattle inoculated with blood of hematuric bovines. In: PROCEEDINGS OF THE SEVENTEENTH INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, 1993, Birmingham, UK. Birmingham, UK, 1993. p. 213.

STOCCO DOS SANTOS, R. C. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n. 9, p. 2127–2135, 1998.

STRAUSS, S. et al. Single-tube real-time nested polymerase chain reaction for detecting human papillomavirus DNA. **Diag. Mol. Path.**, v. 9, n. 3, p. 151–157, 2000.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILLE, P. **Pathology & genetics**: tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC, 2003. v. 4.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. Lack of canonical e6 and e7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **J. Virol.**, v. 76, n. 19, p. 10020–10023, 2002.

TRUNK, M. WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Molecular pathogenesis of cervical cancer and its first steps. **Der. Pathol.**, v. 26, n. 4, p. 283–290, 2005.

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch. Virol.**, v. 148, n. 8, p. 1445–1453, 2003.

TSENG, C. J. et al. Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 166, n. 1, p. 35–40, 1992.

TSENG, C. J. et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mrna in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 5, p. 1391–1391, 1999.

VACCARELLA, S. et al. Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the international agency for research on cancer hpv prevalence surveys. **Int. J. Epidemiol.**, v. 37, n. 3, p. 536–546, 2008.

VELEMA, J. P. et al. Burning wood in the kitchen increases the risk of cervical neoplasia in hpv-infected women in hon- duras. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 97, n. 4, p. 536–541, 2002.

VON KNEBEL-DOEBERITZ, M.; SYRJÄNEN, K. J. Molecular markers: how to apply in practice. **Gynecol. Oncol.**, v. 103, n. 1, p. 18–20, 2006.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9376, p. 2217–2225, 2003.

WALBOOMERS, J. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world- wide. **J. Pathol.**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WALTER- MOURA, J. et al. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. **Experientia**, v. 44, n. 9, p. 785–788, 1988.

WEISMANN, P. et al. The detection of circulating tumor cells expressing E6/E7 hr- HPV oncogenes in peripheral blood in cervical cancer patients after radical hysterectomy. **Neoplasma**, v. 56, n. 3, p. 230–238, 2009.

WENTZENSEN, N.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Biomarkers in cervical cancer screening. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 315–330, 2007.

WENTZENSEN, N.; KLUG, S. J. Early detection of cervical carcinomas: finding an overall approach. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 105, n. 37, p. 617–622, 2008.

WERNESSE, B. A.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science**, v. 248, n.4951, p.

76–79, 1990.

WHITE, A. E.; LIVANOS, E. M.; TLSTY, T. D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the hpv oncoproteins. **Gen. Devel.**, v. 8, n. 6, p. 666–677, 1994.

WHYTE, P. et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus e 1 a proteins bind to the retinoblastoma gene product. **Nature**, v. 334, n. 6178, p. 124–129, 1988.

WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **V. Genes**, v. 24, n. 3, p. 275–290, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human papillomavirus and hpv vaccines: technical information for policy-makers and health professionals**. Geneva, 2007.

XU, S.; LIU, L.; LU, S.; REN, S. Clinical observation on vertical transmission of human papillomavirus. **Chin. Med. Sci. J.**, v. 13, n. 1, p. 29–31, 1998.

XU, Y.F. et al. Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 11, p. 2133–2148, 2006.

YOSHINOUCI, M. et al. Analysis by multiplex pcr of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 11, p. 3514–3517, 1999.

YOU, J. et al. Interaction of the bovine papillomavirus e2 protein with brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 349–360, 2004.

ZERFASS, K. P. et al. Sequential activation of cyclin e and cyclin a gene expression by human papillomavirus type 16 e7 through sequences necessary for transformation. **J. Virol.**, v. 69, n. 10, p. 6389–6399, 1995.

ZHANG, E.-Y.; TANG, X.-D. Human papillomavirus type 16/18 oncoproteins: potential therapeutic targets in non-smoking associated lung cancer. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 13, n. 11, p. 5363–5369, 2012.

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

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Mol. Carcinogenesis**, v. 1, n. 3, p. 147–150, 1988.

ZUR HAUSEN, H. immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. **Semin. Cancer. Biol.**, v. 9, n. 6, p. 405–411, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 1–10, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE

“Estudos integrados sobre o Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres e crianças na população do Estado de Pernambuco”

HPV E CÂNCER CERVICAL

Prezada paciente _____

Convidamos você a participar de um projeto de pesquisa sobre o Papilomavírus Humano, também chamado de HPV, que pode causar câncer de colo uterino. Esse projeto será realizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife/ com início em março de 2011 e término previsto para 2014.

O objetivo deste estudo é investigar a presença de HPV na população e outros fatores que possam estar relacionados com o câncer do colo do útero.

Se você estiver interessado em participar, você responderá um questionário e realizará um exame ginecológico no qual será coletada uma amostra de material do colo do útero para testes. A coleta será feita pelo profissional do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros- CISAM. Além disso, serão coletadas duas amostras de sangue para a pesquisa da presença e tipo viral. Este material será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, situado na Rua Arnóbio Marques, 310, Recife PE e deverá ser utilizado exclusivamente para os testes explicados acima.

Os procedimentos utilizados apresentam baixo risco pois vão seguir sua rotina clínica. Todo o material utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança do laboratório citado.

Participando do estudo, você terá um exame preventivo mais completo, pois serão realizadas as identificações da presença e tipos do HPV. A presença de alguns tipos do vírus é um fator de risco para a formação do câncer. Os seus resultados serão encaminhados ao médico que lhe acompanha no CISAM, onde você fez a coleta e, caso haja alguma alteração, você será informada e acompanhada pela equipe deste Centro.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode deixar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo. Todos os exames e consultas médicas serão gratuitos e a análise do seu material será realizada no Hospital Universitário Oswaldo Cruz e no Instituto Butantan em São Paulo e seguirá rigorosamente os critérios estabelecidos.

Todos os dados coletados serão mantidos em sigilo, cabendo apenas a você e ao médico responsável o conhecimento deles. Você poderá esclarecer qualquer dúvida com a Dra Maria Tereza Cartaxo Muniz pelo telefone (81) 3184-1200 r.160. Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-Complexo hospitalar HUOC/Procape Rua Arnóbio Marques, 310 - Santo Amaro - 50100-130 - Recife-PE. Fone: (81) 3184.1460-Fone/Fax: (81) 3184.1271 - e-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***“Estudos sobre a expressão do Papilomavírus Humano (HPV): avaliação comparativa sobre lesões, sangue periférico e retinoblastomas”***. Eu discuti com o responsável pela pesquisa sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

____/____/____

Assinatura da Paciente / Representante Legal

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura

Recife, ____ de ____ de 20__

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE

“Estudos integrados sobre o Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres e crianças na população do Estado de Pernambuco”

HPV E RETINOBLASTOMA

Prezado (a) paciente _____

Convidamos você a participar de um projeto de pesquisa sobre o Papilomavírus Humano, também chamado de HPV, vírus que pode possuir uma ligação com retinoblastoma. Esse projeto será realizado no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife/PE com início em março de 2011 e término previsto para junho de 2014.

O objetivo deste estudo é investigar a presença de HPV na população e outros fatores que possam estar relacionados com o câncer de retina.

Se você estiver interessado em participar, você responderá um questionário. A coleta será realizada pelo profissional do Hospital Oswaldo Cruz, no momento da cirurgia de enucleação. Além disso, serão coletadas duas amostras de sangue (punção periférica da veia do antebraço) para a pesquisa da presença e tipo viral. Este material será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, situado na Rua Arnóbio Marques, 310, Recife PE e deverá ser utilizado exclusivamente para as finalidades acima.

Os procedimentos utilizados não apresentam risco para o paciente já que a coleta do tumor será realizada após a cirurgia marcada a partir consentimento do paciente e seus responsáveis. O presente projeto fará parte apenas da obtenção do material após a cirurgia, não participando do processo cirúrgico em si. Para diminuir quaisquer possíveis riscos na coleta sangüínea, todo o material utilizado será descartável, seguindo as normas de biossegurança estabelecidas pelo laboratório.

Participando do estudo você estará contribuindo para o estudo do HPV e retinoblastoma. Além disso, haverá triagem para presença e tipos do HPV e estudos de expressão viral, o que pode ser um indicativo da possível progressão para o câncer. Os seus resultados serão encaminhados ao médico que lhe acompanha no Hospital Oswaldo Cruz, onde você fez a coleta e, caso haja alguma alteração, você será informado e acompanhado pela equipe deste Hospital.

Sua participação nesse projeto é voluntária. Você pode abandonar o estudo em qualquer momento sem que isto lhe cause qualquer prejuízo, inclusive no seu acompanhamento. Todos os exames e consultas médicas serão gratuitos e a análise do seu material será realizada no Hospital Universitário Oswaldo Cruz e no Instituto Butantan em São Paulo e seguirá rigorosamente os critérios estabelecidos.

Todos os dados obtidos serão mantidos em sigilo, cabendo apenas a você e ao médico responsável, o conhecimento deles. Você poderá esclarecer qualquer dúvida com a Dra Rita Maria Tereza Cartaxo Muniz pelo telefone (81) 3184-1200 r.160. Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos-Complexo hospitalar HUOC/Procape Rua Arnóbio Marques, 310 - Santo Amaro - 50100-130 - Recife-PE. Fone: (81) 3184.1460-Fone/Fax: (81) 3184.1271 - e-mail: cep_huoc.procape@yahoo.com.br.

Desde já, agradecemos sua colaboração.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ***“Estudos sobre a expressão do Papilomavirus Humano (HPV): avaliação comparativa sobre lesões, sangue periférico e retinoblastomas”***. Eu discuti com o responsável pela pesquisa sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando

necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

____/____/____

Assinatura do Representante Legal

____/____/____

Assinatura da Testemunha

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura

Recife, ____ de _____ de 20__

Tontura() Fraqueza () Ataques () Náusea () Sonolência ()
) Coceira ()

Dor () onde: _____

Apresenta alguma doença crônica? () Não () Sim Qual? _____

Portadora de HIV? () Não () Sim Desde quando está ciente da doença? _____

Utiliza algum(ns) medicamento(s) de uso contínuo? Não () Sim ()

Qual(is)? _____

Tabagismo: Fuma? () Nunca fumou () Não agora, mas já fumou () Fumante passiva

Tipo: () Cigarro palha () Cigarro c/ filtro () Cigarro s/ filtro () Charuto () Cachimbo

Idade em que: Iniciou: _____ Parou: _____ N° de Anos: _____

Quantidade: _____

Obs.: _____

Bebidas alcoólicas: Consome? () Não () Sim () Não agora, mas já consumiu

Tipo: Aguardente () Cerveja () Vinho () Outros () _____

Idade em que: Iniciou: _____ Parou: _____ N° de Anos: _____

Quantidade: _____

Obs.: _____

Ingestão de frutas e verduras (g/dia)

Fruta : _____

Verdura: _____

Há alguém da família com verminoses? () Não () Sim () Não Sabe

Há alguma(s) infecção(ões) recorrente(s) na família? () Não () Sim () Não Sabe

Há algum(ns) parente(s) que apresenta(m) doença(s) crônica(s)? () Não () Sim

Qual(is)? _____

Há histórico de câncer na família? () Não () Sim

Em caso positivo: Tipo: _____ Grau de parentesco: _____

Alguém da família se queixa de:

() Não () Sim Quem? _____

Tontura() Fraqueza() Náusea() Sonolência() Coceira() Dor()

Onde? _____

Ao questionador:

Como você julga o estado de atenção do entrevistado?

() Bastante disperso () Disperso () Atento () Bastante atento

Como você julga a compreensão do entrevistado sobre o que lhe é perguntado?

() Não compreende () Compreende com dificuldade () Compreende