

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

KAMYLLA CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO

**Avaliação da presença do *Papilomavírus Humano* (HPV) no
sangue periférico de mulheres com lesões intraepiteliais de
alto grau e baixo grau**

Recife

2017

KAMYLLA CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO

**Avaliação da presença do Papilomavírus Humano
(HPV) no sangue periférico de mulheres com lesões
intraepiteliais de alto grau e baixo grau**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos necessários para
obtenção do grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador(a): Dr. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientador(a): Dra. Ana Pavla Diniz Gurgel

Dra. Elyda Gonçalves de Lima

Recife

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR(A)

Prof. Dr. Sílvio Romeno Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO Prof. Dr. Paulo Savio Angerías de Goes

DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda de Larrazábel

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR(A) DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Soares

Catálogo na Fonte: Bibliotecária
Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Nascimento, Kamylla Conceição Gomes
Avaliação da presença do Papilomavírus humano (HPV) no sangue periférico de
mulheres com lesões intraepiteliais de alto e baixo grau / Kamylla Conceição Gomes
Nascimento. – Recife: O Autor, 2017.

67 f.: il., fig, tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientadores: Ana Pavla Diniz Gurgel e Elyda Gonçalves de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Inovação Terapêutica, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Colo uterino- câncer 2. Papilomavirus 3. Sangue I. Freitas, Antonio
Carlos de (orient.) II. Gurgel, Ana Pavla Diniz (coorientadora) III. Lima,
Elyda Gonçalves de (coorientadora) IV. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-288

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: NASCIMENTO, Kamylla Conceição Gomes

Título: Avaliação da presença do Papilomavírus Humano (HPV) no sangue periférico de mulheres com lesões intraepiteliais de alto grau e baixo grau

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 24/ 03/ 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Bárbara Simas Chagas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

À minha família, que precisou dizer inúmeras vezes “não” para os seus sonhos, para que eu pudesse dizer “sim”.

Agradecimentos

À Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada;

Aos meus pais, **Glaucemar das Neves** e **Luis Nascimento**, pelo amor incondicional, carinho, compreensão e paciência durante toda essa caminhada. Ao meu irmãos, **Victor Thomas e Juliana Karla** por todos os momentos de companheirismo, alegria e descontração;

À minha amada e doce avó, **Maria das Neves**, por todos os ensinamentos e amor durante toda a minha vida;

Às minhas tias, **Fabiana Neves, Gilvania Gomes e Genialda Gomes**, portodo amor incondicional, apoio, confiança e por sempre acreditar no meu potencial;Ao meu orientador, **Antonio Carlos de Freitas** por todos os ensinamentos, apoio, paciência e confiança;

À minhas queridas co-orientadoras **Ana Pavla e Elyda Gonçalves** que contribuíram indispensavelmente para o andamento desse trabalho, por todo carinho e principalmente paciência;

Ao professor, **Jacinto Costa**, por todos os ensinamentos e paciência;

À minha amiga **Dafne Quixabeira**, por todo apoio e momentos de descontração;

Aos amigos do LEMTE, por todos os ensinamentos, discussões acadêmicas, apoio, partilhas e inestimável companheirismo, em especial **Ruanny Cristine, Daffany Luana, Talita Helena, Antônio Humberto, Marconi Rego**, por ajudarem tornar a rotina mais fácil e por serem sempre “minha pessoa” durante toda essa jornada;

À **Jonathan Medeiros**, pela disponibilidade e indispensável ajuda em etapas importantes do trabalho;

À professora **Rocio Hassan** e a todos que fazem parte do Departamento de Oncovirologia/ INCA, por todo o ensinamento, paciência e sugestões na realização desse projeto;

Aos amigos do LEMTE: **Ana Jéssica, Rita de Cássia, André Luís, Lúgia Leal, Ana Paula, Barbara Simas, Marcelo Nazário, Nayara Evaristo, Elias Tibúrcio**, por todo apoio e convivência aos longos desses anos;

Ao **Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT)**;

À médica **Mariléa Guimarães** e a todos os funcionários do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC- UFPE), pela prontidão na ajuda e atenção;

À **Paulo Germano**, secretário do PPGIT, pela inestimável ajuda nos processos burocráticos;

À todos os funcionários do Laboratório Central da UFPE (LABCEN), em especial **Dona Carmen e Patrícia**, pelos momentos de descontração;

Aos órgãos financiadores que tornaram possível a realização desse projeto **FACEPE, CAPES e CNPq**;

À todas as mulheres que voluntariamente participaram desse projeto;

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.

(Martin Luther King)

Resumo

Estudos tem demonstrado o envolvimento do HPV em epitélios e mucosas não cervicais. Essas observações levantam questões sobre como o HPV poderia chegar nesses tecidos. Especula-se que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) infectadas podem se espalhar e infectar outros sítios corporais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi detectar e analisar a participação do sangue periférico no processo de infecção relacionado ao HPV. Para tanto, foi realizado a detecção do DNA HPV em 153 amostras de raspagem cervical e sangue periférico. A detecção do DNA HPV foi realizada utilizando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores degenerados MY09/11, seguida de *nested* com os primers GP05/06. As amostras HPV positivas foram genotipadas por sequenciamento. A determinação da carga viral e do status físico do vírus foi realizada através de qPCR. O DNA do HPV foi detectado em 47,3% das amostras de sangue periférico e 42,7% das amostras cervicais. Nas amostras positivas no sangue foram detectados cinco genótipos virais: HPVs 16, 18, 33, 58 e 66. O HPV 16 foi o genótipo viral mais frequente detectado no sangue, sendo detectado em 48% dos casos. Com relação a carga viral no sangue, observou-se uma média de 52,26 cópias absolutas de E6 em pacientes com lesões pré neoplásica e câncer cervical e de 61,20 cópias absolutas de E6 em pacientes sem lesão. Quanto ao status físico do DNA HPV no sangue, a forma mista (epissomal e mista) foi predominante nas amostras de pacientes sem lesão, com lesões pré neoplásicas e câncer cervical, sugerindo que o sangue esteja envolvido no processo de disseminação e latência do vírus.

Palavras-chave: Câncer cervical. Lesão cervical. Papilomavírus humano (HPV). Sangue. Carga viral. Status físico do vírus

Abstract

Studies have demonstrated the involvement of HPV in non-cervical epithelia and mucosae. These observations raises questions about how HPV could reach these tissues. It is speculated that infected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) may spread and infect other body sites. Therefore, the aim of the present study was to detect and analyze the participation of peripheral blood in the HPV-related infection process. To do so, HPV DNA was detected in 153 samples of cervical scraping and peripheral blood. HPV DNA detection was performed using the polymerase chain reaction (PCR) with degenerate primers MY09 / 11, followed by nested primers GP05 / 06. HPV positive samples were genotyped by sequencing. Determination of viral load and virus physical status was performed using qPCR. HPV DNA was detected in 47.3% of the peripheral blood samples and 42.7% of the cervical samples. Among the positive samples in the blood, five viral genotypes were detected: HPVs 16, 18, 33, 58 and 66. HPV 16 was the most frequent viral genotype, being detected in 48% of the cases. Regarding blood viral load, we observed a mean of 52.26 absolute copies of E6 in patients with pre-neoplastic lesions and cervical cancer and 61.20 absolute copies of E6 in patients without lesion. Concerning the physical status of HPV DNA in the blood, the mixed form was predominant in the samples of patients without lesions, with pre-neoplastic lesions and cervical cancer, suggesting that the blood is involved in the process of virus dissemination and latency.

Key words: Cervical cancer. Cervical injury. Human papillomavirus (HPV). Blood. Viral charge. Physical status of virus.

Lista de Ilustrações

	Página
Figura 1	Estrutura do papilomavírus 20
Figura 2	Representação esquemática do genoma viral do HPV16 21
Figura 3	Ação da proteína E6 sobre o ciclo celular 23
Figura 4	Ação da oncoproteína E7 sobre o ciclo celular 23
Figura 5	Ciclo de infecção do HPV 26
Figura 6	Hipótese sobre a forma de transmissão do BPV em tecidos sanguíneos e outros fluidos de bovino 28
Figura 7	Possível rota de liberação do HPV para corrente sanguínea durante a metástase 29
Figura 8	Hipótese de liberação do HPV paracorrente sanguínea durante a apoptose 30
Figura 9	Hipótese de como o HPV é liberado na corrente sanguínea. 31
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos amplificados para o gene da β - globinadas amostras de raspagem cervical 39
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos amplificados para o gene da β - globinadas amostras de sangue 40
Figura 12	Eficiência dos <i>primers</i> e curva de <i>melting</i> dos genes E2 e E6 do HPV16 45
Gráfico 1	Prevalência do DNA do HPV na região da cérvix de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil. 40
Gráfico 2	Prevalência do DNA do HPV em amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil 41
Gráfico 3	Análise citológica da região cervical das pacientes positivas para o DNA do HPV em sangue periférico 41
Gráfico 4	Distribuição dos HPVs detectados em amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da Região Nordeste do Brasil 42

Gráfico 5	Comparação da presença do vírus na região cervical e sangue periférico de mulheres oriundas da região metropolitana de Recife, Pernambuco	43
Gráfico 6	Tipos de HPV presente na cérvix e no sangue	43

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1	Funções das principais proteínas do HPV 24
Tabela 2	Deteção do DNA do HPV em sangue periférico 27
Tabela 3	Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos 35
Tabela 4	Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas e clínicas e a detecção viral na corrente sanguínea 44
Tabela 5	Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do <i>Status</i> físico em amostras com diferentes tipos de lesão cervical e câncer cervical 46
Tabela 6	Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do <i>Status</i> físico em pacientes sem histórico de lesão cervical 47

Lista de Abreviaturas

Item	Definição
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPV	Papilomavírus bovino
CDK	Quinase dependente de ciclina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
E	Proteínas virais classificadas como precoces (<i>E-Early</i>)
E2F	Fator de Transcrição E2F
E6AP	Complexo E6 ligase ubiquitina celular
EBV	Epstein-Barr Virus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus Humano
HPSG	Heparan sulfato proteoglicano
HR-HPV	Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
L	Proteínas virais classificadas como tardias (<i>L-Late</i>)
LCR	Região longa de controle
LR-HPV	Papilomavírus humano de baixo risco oncogênico
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OR	Odds Ratio

ORF	Quadro aberto de leitura
P53	Proteína supressora de tumor
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRb	Proteína do retinoblastoma
PVs	Papilomavírus
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Papilomavírus Humano (HPV).....	20
2.2	Ciclo de Replicação Viral.....	25
2.2.1	Papilomavírus Humano (HPV) no sangue periférico	27
2.2.2	Possíveis rotas de disseminação do HPV pelo sangue.....	28
2.2.3	Associação do HPV no sangue periférico e outros câncer	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	METODOLOGIA.....	34
4.1	Amostras biológicas.....	34
4.2	Critérios de Elegibilidade	34
4.3	Coleta de material biológico	34
4.4	Extração do DNA.....	35
4.5	Deteção do DNA viral e genotipagem.....	35
4.6	Status físico e carga viral	36
4.7	Análise Estatística	37
4.8	Considerações éticas	38
5	RESULTADO	39
5.1	Características da população estudada	39
5.2	Prevalência da infecção por HPV no sangue periférico e na região cervical	39
5.3	Avaliação da carga viral e do status físico do vírus em sangue periférico	45
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/CCS/UFPE.....	65
	ANEXO B- PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE	68

1 INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus (PVs) são um grupo de vírus pequenos não envelopados, de DNA fita dupla circular. Estão classificados na família *Papillomaviridae*, e classificados em 35 gêneros. O Papilomavírus Humano (HPV) está relacionado com alterações cervicais que podem levar ao surgimento do câncer cervical (DE FREITAS et al., 2012; HAUSEN, 1996). A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente em todo o mundo. Conforme as estimativas, a maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terão contato com o vírus durante algum momento da vida

(BRUNI et al., 2016; BOSCH et al., 2013; DESANJOSE et al., 2010; MUÑOZ et al., 2003).

Embora os Papilomavírus sejam descritos como epiteliotrópicos ou mucosotrópicos, a atividade desse vírus já foi demonstrada em sítios não epiteliais como sangue, sêmen, placenta (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2017; DEPUYDT et al., 2016; CHISANGA et al., 2015). Além disso, recentemente, diversos estudos tem demonstrado o envolvimento do HPV em epitélios e mucosas não cervicais, tais como vulva, vagina, pênis, testículo, ânus, mama, pulmão e pele (DE FREITAS et al., 2016; BUCCHI et al., 2016; DE SANJOSE et al., 2014; BOSCH et al., 2013; SIGAROODI et al., 2012; MACHALEK et al., 2012; MIRALLES-GURI et al., 2009; CARTER et al., 2001).

Essas observações levantam questões sobre como o HPV poderia se estabelecer nestes tecidos. A exemplo de outras infecções virais, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) infectadas podem se espalhar e infectar outros sítios, a exemplo do Epstein-Barr Virus (EBV). Assim, especula-se que PBMC possa executar esta função nas infecções causadas pelo HPV em sítios não cervicais. Alguns estudos têm demonstrado a presença e a expressão de DNA do HPV na corrente sanguínea, em pacientes infectados com HPV genital e pacientes que não apresentaram queixas clínicas ou histórico de infecção por HPV genital até o momento da coleta de sangue (CHE-HA CHEN et al. 2009; BODAGHI et al. 2005; CHIH-MING HO et al 2005).

Apesar disso, não está bem estabelecido o papel do vírus no sangue periférico durante o processo carcinogênico mediado pelo HPV. Portanto, estudos que possibilitem a compreensão do papel do HPV na corrente sanguínea poderiam esclarecer a etiopatogênese de diferentes tipos de câncer, resultando no impacto das estratégias utilizadas para prevenção do câncer e consequente avanço terapêutico.

Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi detectar e analisar a presença e a carga viral do DNA do HPV em sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesões cervicais intraepiteliais e câncer, oriundas da região metropolitana de Pernambuco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papilomavírus Humano (HPV)

O Papilomavírus Humano (HPV) é um pequeno vírus de DNA de dupla fita circular pertencente à família *Papillomaviridae*, composto por um capsídeo não envelopado e icosaédrico. Contêm aproximadamente 8000 pares de bases (AL) e seu DNA está associado com as histonas H2A, H2B, H3 e H4 (SANTOS-LÓPEZ et AL., 2015; DE VILLIERS et AL., 2004; HAUSEN, 1996) (figura 1).

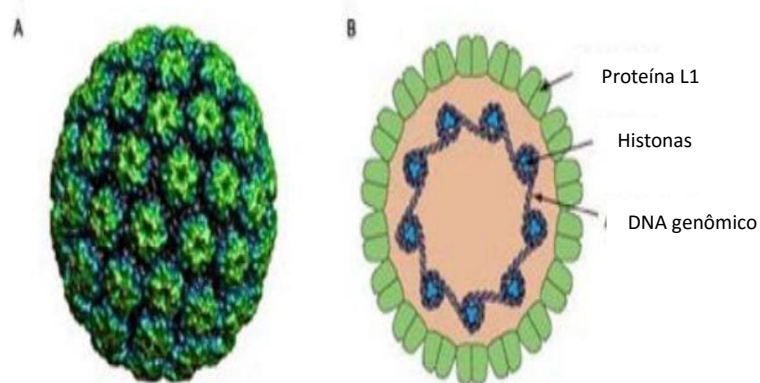


Figura 1. Estrutura do papilomavírus. A) Imagem em 3D de virion que foi reconstruído com base na proteína L1. B) Diagrama do capsídeo do HPV. (SANTOS-LÓPEZ et AL., 2015).

O genoma apresenta 8 ORFs (*Open Reading Frames* ou Quadro Aberto de Leitura) e pode ser dividido em três regiões: a região de expressão precoce E (*Early*), que codifica as proteínas E1, E2, E4, E6 e E7 envolvidas na replicação viral; a região de expressão tardia L (*Late*) que codifica as proteínas L1 e L2, responsáveis pelo o encapsulamento do genoma viral; a região longa de controle (LCR – *Long Control Region*) (BERNARD et AL., 2010; MUÑOZ et AL., 2003; ZUR HAUSEN, 2002; HAUSEN, 1996) (figura 2).

Quanto à estrutura viral, as proteínas E1 e E2 são essenciais para a replicação e amplificação do epissoma viral no núcleo das células infectadas (WILSON et AL., 2002). Já a proteína E4 tem papel importante para a amplificação do genoma e síntese viral. Além do mais, E4 também controla a maturação do vírus e facilita a liberação de vírions (DOORBAR, 2013; FERNANDES et AL., 2013). Enquanto que as oncoproteínas E5, E6 e E7 têm características oncogênicas que interferem na immortalização e transformação celular.

A proteína E5 desempenha função na transformação celular, tumorigênese e modulação imunológica. No entanto, provavelmente, esteja relacionado aos estágios iniciais da carcinogênese provocada pelo HPV, uma vez que o gene E5 normalmente não é expresso quando o genoma viral está integrado (VENUTI et AL., 2011; DOORBAR, 2006, 2005; STERLINKO GRM et AL., 2004).

As oncoproteínas E6 e E7 têm funções na immortalização e transformação celular e ambos associam-se com reguladores do ciclo celular (DUENSING; MÜNGER, 2004; ZUR HAUSEN, 2002). E6 estimula a ubiquitinação e a degradação proteossômica do supressor de tumor p53, através da ligação de E6 com a ubiquitina-ligase E3, formando um complexo E6AP, que degradará a p53 (BERNARD et AL., 2011) (figura 3). Adicionalmente E6 pode inativar outras proteínas pró-apoptóticas como a Bak ou Bax (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013; DOORBAR et AL., 2012b). Diversos estudos descrevem a associação de E6 com uma vasta gama de proteínas importantes para regulação celular, tais como: proteínas envolvidas na regulação da transcrição do DNA; proteínas envolvidas na adesão célula-célula; proteínas envolvidas no reparo do DNA; proteínas envolvidas na diferenciação celular (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013; DOORBAR, 2005; YIM; PARK, 2005; YIM et AL., 2004). No entanto, o papel exato do E6 nessas vias ainda é incerto.

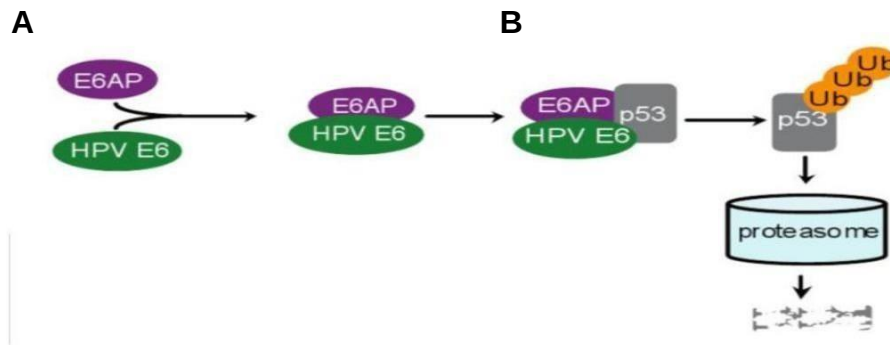


Figura 3. Ação da proteína E6 sobre o ciclo celular. A) A proteína p53 tem como função parar o ciclo celular em resposta a algum dano no DNA. B) A proteína E6 se liga a E6AP que degrada a proteína p53 via ubiquitina-proteassomo. Fonte: Adaptado de MALECKA et AL., 2014.

Diferentemente de E6, E7 tem como principal alvo o gene do retinoblastoma (pRb) e impede a associação entre pRb e a família E2F (ZUR HAUSEN, 1996). Em condições normais a pRb previne a célula da entrada no ciclo celular e regula a transição da fase G1/S (TOMAIĆ, 2016; NAVARRO et AL., 2013; ROMAN; MUNGER, 2013^a HAUSEN, 1996). Na fase final de G1, pRb é fosforilado por complexo de quinase ciclina dependente (CDK), o que leva a dissociação de pRb de E2F, permitindo a entrada da célula na fase S (LEE et AL., 2001; ZUR HAUSEN, 1996). A oncoproteína E7 liga-se a pRb impedindo a dissociação de pRb-E2F, promovendo a expressão contínua de E2F resultando na passagem de fase prematura (DOORBAR, 2016; ROMAN; MUNGER, 2013b) (figura 4).

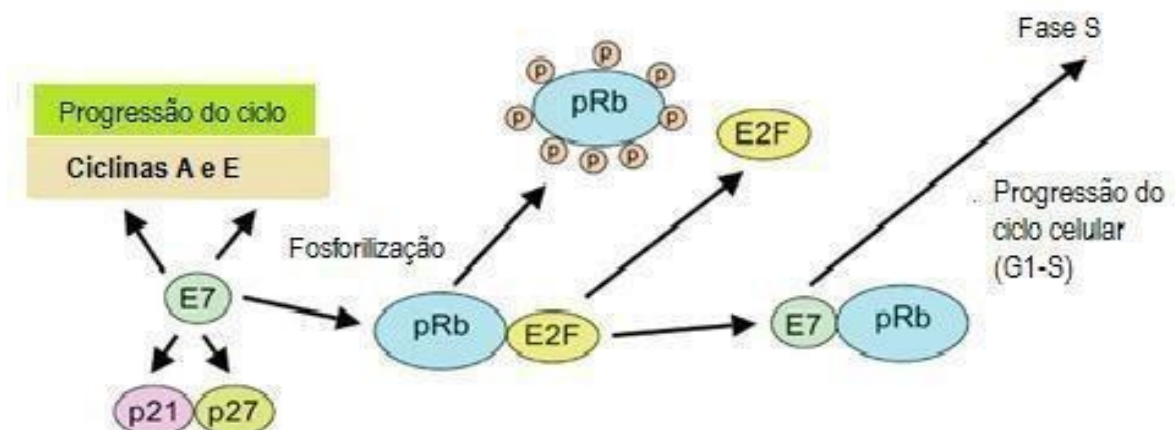


Figura 4. A ação da oncoproteína E7 sobre o ciclo celular. A) A ligação da proteína pRb com o fator de transcrição E2F resulta na parada do ciclo celular. B) Ligação de E7 a pRb que resulta na liberação de E2F, causando o estímulo constante da divisão celular. Fonte: adaptado SENBA; MORI, 2012.

Além disso, a oncoproteína E7 se liga às proteínas p21 e p27, reprimindo sua função de inibir o ciclo celular em resposta a algum dano

celular. O principal alvo de p21 e p27 é CDK2, responsável pela progressão do ciclo celular, através das ciclinas A e E. A oncoproteína E7 se liga à p21 e p27 neutralizando os efeitos inibitórios sobre as ciclinas A e E (BOULET et AL., 2007; LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

As proteínas de expressão tardia L1 e L2 são responsáveis pela formação do capsídeo viral (CHEN et AL., 2000; ZUR HAUSEN, 1996). L1 é a principal proteína do capsídeo com o arranjo estrutural de 320 moléculas de L1, organizadas em 72 pentâmeros (ou capsômeros), numa estrutura icosaédrica. L1 constitui toda a superfície do vírion e medeia a ligação viral na superfície celular (BUCK; DAY; TRUS, 2013; FRATI et AL., 2011; OKUN et AL., 2001). L2 é a menor proteína do capsídeo, com aproximadamente 12 cópias, é essencial na infecciosidade e desempenha papéis indispensáveis no processo infeccioso viral (WANG; RODEN, 2013; ALP AVCI, 2012;). As funções das proteínas do HPV estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Funções das principais proteínas do HPV. As proteínas expressas na fase precoce designadas (E) e as proteínas expressas na fase tardia designadas (L) do

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

Papilomavírus humano (HPV). Fonte: BOULET et AL., 2007

2.2 Ciclo de Replicação Viral

Inicialmente, a infecção ocorre com o acesso das partículas virais à camada basal do epitélio escamoso encontrado na cérvix uterina (DOORBAR, 2005). Essas se tornam expostas por meio de microlesões no epitélio que são provocadas por meio do ato sexual ou trauma mecânico (DOORBAR et AL., 2012b).

Ainda não está totalmente elucidado o mecanismo utilizado pelo HPV para entrada do vírus na célula (DOORBAR, 2006). Acredita-se que a interação da região C-terminal da proteína L1 com os receptores celulares proteoglicanas heparan-sulfato são responsáveis pelo reconhecimento e ligação dos vírions às células (DOORBAR, 2005; CAMPO, 2003;). A internalização ocorre por endocitose, em seguida ocorre o desnudamento do capsídeo viral e exposição do genoma (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). A proteína L2 facilita então a transferência do genoma viral ao núcleo (DAY et AL., 2004).

As proteínas E1 e E2 são as primeiras a serem expressas e são essenciais para amplificação inicial. E1 e E2 mantém o vírus em baixo número de cópias e na forma episomal (DOORBAR et AL., 2012; HELLNER; MÜNGER, 2011; WILLIAMS et AL., 2011). E1 funciona como helicase replicativa que utiliza a maquinaria da célula do hospedeiro infectada para amplificar e replicar seu genoma (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013). E1 deve primeiro reconhecer as origens de replicação (ORI), região rica em AT localizada no segmento 3' da LCR (MCINTOSH et AL., 2010; WILSON et AL., 2002; LEE et AL., 1997).

No entanto, E1 é expresso em níveis muito baixos e tem baixa afinidade com as ORI, a ligação entre E1 e as origens de replicação é facilitada pela presença da proteína E2, formando um heterodímero E1-E2-ori que possui alta afinidade pelo DNA, permitindo a atividade catalítica de síntese de DNA (BERGVALL; MELENDY; ARCHAMBAULT, 2013; CHEN; STENLUND, 2001).

A oncoproteína E2 está envolvida em muitos processos virais, principalmente associados a transcrição e replicação do genoma viral (LU et AL., 1993), além da função de recrutar E1 para a origem viral de replicação. E2 associasse com proteínas de regulação transcricional, processamento de RNA, apoptose e proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (MCBRIDE, 2013). Durante a amplificação o E2 modula negativamente as oncoproteínas

E6 e E7. Contudo, após algum evento mutagênico ou de integração, ocorre a diminuição da atividade repressora do E2, e por AL26seqüência a superexpressão dos oncogenes E6 e E7 (DOORBAR, 2005).

As proteínas E6 e E7 são essenciais para a imortalização celular, uma vez que elas têm como função primordial bloquear as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb respectivamente (ZUR HAUSEN, 2002). Além disso, essas oncoproteínas levam a reentrada das células da camada superior do epitélio para fase a S do ciclo celular (HONG; LAIMINS, 2013).

Nas camadas mais diferenciadas do epitélio cervical, são expressas os genes de expressão tardia que compreendem o gene E4 e os genes L1 e L2. E4 associa-se aos filamentos de queratina, comprometendo a montagem normal do envelope cornificado facilitando a liberação e a transmissão do vírus e, portanto, a infecciosidade e a transmissão (DOORBAR, 2013; MCINTOSH et AL., 2010). Os genes L1 e L2 são responsáveis pela montagem do capsídeo viral e liberação da partícula viral madura (WANG;RODEN, 2013; HOLMGREN et AL., 2005b, 2005^a; OKUN et AL.,2001).

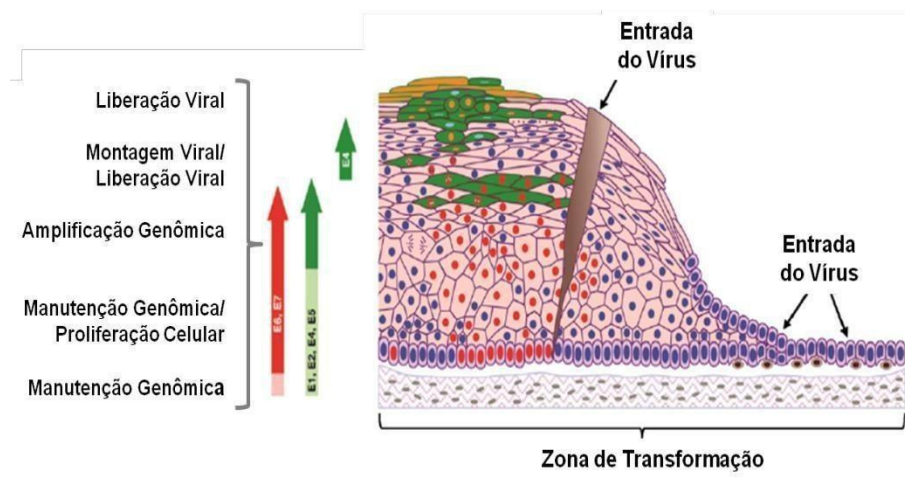


Figura 5. Ciclo de infecção do HPV. Após a exposição da camada basal do epitélio cervical devido a micro-abrasões. Os genes de E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral replica a partir do DNA episossomal. Nas camadas superiores do epitélio ocorre a expressão dos genes tardio L1, L2, e o gene precoce E4. Ocorrendo desta maneira, a encapsulação do genoma viral e posterior liberação das partículas virais com o descamamento dos queratinócitos. Fonte: Adaptado de (DOORBAR et AL., 2012b)

2.2.1 Papilomavírus Humano (HPV) no sangue periférico

Alguns autores têm demonstrado a presença e a expressão do DNA do HPV na corrente sanguínea (BODAGHI et al., 2005a; HO et al., 2005b; TSENG et al., 1999; PAO et al., 1997, 1991). PAO et al., 1991, foram os primeiros a descrever a presença do DNA do HPV em sangue periférico de pacientes HPV-positivas no trato genito-urinário. Posteriormente, outros estudos também confirmaram a presença do DNA do HPV em sangue periférico (Tabela 2). Dentre os genótipos detectados o HPV16 é o tipo mais prevalente, seguido pelo HPV 18 (GNANAMONY et al., 2010; SATHISH et al., 2004b; WIDSCHWENDTER et al., 2003b). E as taxas de detecção variam entre 7% a 65% (BODAGHI et al. 2005; HO et al. 2005; KAY et al. 2005; WIDSCHWENDTER et al. 2003; DONG et al. 2002; PORNTANAKASEM et al. 2001). Possíveis explicações para essas discrepâncias nas taxas de detecção são: dificuldade em detectar o vírus, decorrente do tipo de metodologia empregada; baixa carga viral e baixa frequência de HPV na população estudada (GNANAMONY et al., 2010).

Tabela 2. Detecção do DNA do HPV em sangue periférico

AUTOR	PRIMER	TIPO DE HPV	ESTÁGIO
PAO et al., 1991	E6 HPV 16	HPV 16	Carcinoma invasivo
PAO et al., 1997	E6 HPV 16	HPV 16	Carcinoma invasivo
PORNTANAKASEM et al., 2001	E6 HPV 16 e E6 HPV 18	HPV 16 e HPV 18	NIC III e Câncer cervical
LIU et al., 2001	E6 HPV 16 e E6 HPV 18	HPV 16 e HPV 18	Câncer cervical
SATHISH et al., 2004	MY09/11	HPV 16 e HPV 58	Carcinoma invasivo
BODAGHI et al., 2005	L1 HPV 16	HPV 16	Sem histórico de lesão
HO et al., 2005	Primer específicos	HPV 16, HPV 18 e HPV 52	Carcinoma invasivo
WEI; CHOU; CHU, 2007	MY 09/11 e (CC12 e CC14)	HPV 16, HPV 18, HPV 31 e HPV 58	Carcinoma invasivo
CHEN et al., 2009	FAP59/FAP64	HPV16, 18, 27,32,70,97,102,12,15,47,48	Sem histórico de lesão
GNANAMONY et al., 2010	E6 HPV 16 e E6 HPV 18	HPV16 e HPV18	Carcinoma invasivo

Até o momento existem poucas evidências que demonstram a presença e o papel do DNA do HPV no sangue periférico humano (ALVAREZ-ROSETO et al., 2008). Por isso, o Papilomavírus bovino (BPV) tem sido um modelo experimental amplamente utilizado no estudo do HPV. Algumas pesquisas demonstraram a presença e a expressão de genes do BPV em sangue total de bovinos e em células reprodutivas (SILVA et al., 2014, 2012; BRANDT et al., 2011, 2008; YAGUIU et al., 2008; FREITAS et al., 2003; CARVALHO et al., 2003).

No caso do BPV, alguns autores sugerem que o sangue possa atuar como sítio de reserva e propagação para o vírus (Figura 6) (BRANDT et al., 2008; FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2003). Assim, após infectar o epitélio, o vírus causa uma lesão induzindo uma resposta imune, predominantemente linfocitária, e a partir disso as células transportariam o BPV para os demais sítios corporais (BRANDT et al. 2008; FREITAS et al. 2003).

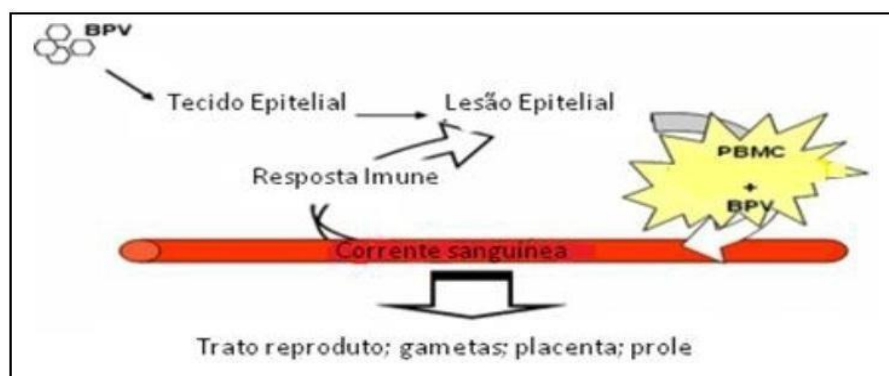


Figura 6. Hipótese sobre a forma de transmissão do BPV em tecidos sanguíneos e outros fluídos de bovino. Após de infectar o tecido o HPV gera uma resposta imune e essa resposta é predominantemente linfocitária. Os linfócitos infectados leva o DNA do HPV para outros tecidos. Adaptado de Freitas et al.,2007.

Esta hipótese foi fortalecida pelos resultados de ROPERTO e colaboradores (2008) e (2011), que demonstraram a expressão de genes estruturais e não estruturais bem como a produção da oncoproteína E5 em linfócitos de bovinos, afetados por câncer de bexiga decorrente da infecção por BPV-2.

2.2.2 Possíveis rotas de disseminação do HPV pelo sangue

A presença do DNA do HPV na corrente sanguínea e o papel desse tecido na carcinogênese mediada pelo HPV ainda é incerta. Portanto, algumas

hipóteses vem sendo levantadas para presença do DNA viral plasmático: (i) metástase; (ii) apoptose; (iii) DNA-HPV plasmático não estaria ligado ao tumor (PORNTHANAKASEM et al., 2001b).

A primeira hipótese seria que o DNA viral detectado na corrente sanguínea seria produto de metástase. À medida que um tumor primário cresce, necessita de suprimentos de sangue para que ele possa desenvolver, sendo recrutados novos vasos sanguíneos em um processo denominado angiogênese (GKOUNTELA; ACETO, 2016; SCHROEDER et al., 2011). As células tumorais podem entrar na circulação sanguínea e extravasar para outros tecidos (THERIAULT; THERIAULT, 2012) (Figura 7). Com base nisso, a maior parte dos estudos associam o DNA do HPV detectado na corrente sanguínea como produto de metástase do câncer do colo do útero (KAY et al. 2005; WIDSCHWENDTER et al.2003; DONG et al.2002; PAO et al.,1997; TSENG et al., 1999;). Como exemplo disso, estão os trabalhos realizados por Wei et al. (2007) e Widschwendter et al,(2003b) que detectaram o DNA do HPV em carcinoma escamoso e câncercervical.

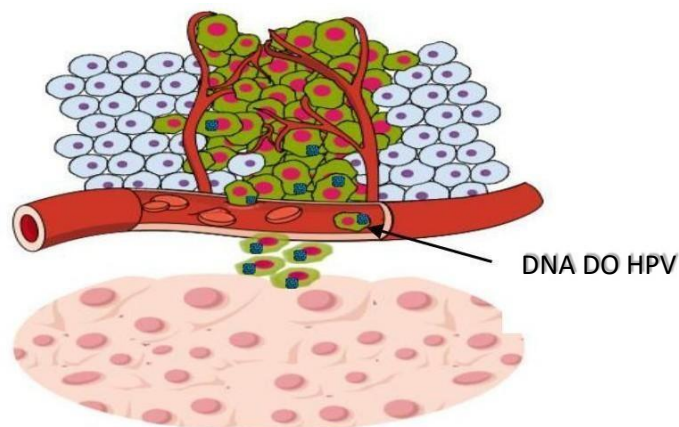


Figura 7: Possível rota de liberação do HPV para corrente sanguínea durante a metástase. Primeiramente, as células metastáticas devem se libertar do tumor primário e atingir a corrente sanguínea. Depois de atingir o sítio secundário, as células cancerosas ultrapassam a corrente sanguínea e colonizam o tecido secundário. Autotransplantação.

No entanto, estudos realizados por Bodaghi et al. (2005a) e Chen et al. (2009), demonstram a presença do vírus em pacientes sem histórico de câncer cervical. Outro trabalho semelhante mostra que os níveis séricos do HPV diminuíram com o início do tratamento primário (WIDSCHWENDTER et al., 2003). Além disso, no caso do BPV já foi demonstrado a presença da oncoproteína E5 em linfócitos de bovinos com tumores de bexiga, no entanto, esse tipo tumoral apresenta um baixo potencial metastático (ROPERTO et al.,

2011, 2010). Esses fatos são fortes indícios que o DNA do HPV detectado na corrente sanguínea pode não está relacionado com câncer primário.

Outra hipótese para a detecção do HPV plasmático estaria relacionado à apoptose (GNANAMONY et al., 2010; PAO et al., 1997). Em consequência da apoptose, a célula perde integridade da membrana plasmática, resultando na liberação do DNA do HPV para a corrente sanguínea (WIDSCHWENDTER et al., 2003; LIU et al., 2001) (figura 8). No entanto, essa possibilidade é pequena, uma vez que em tumores cervicais a oncoproteína E6 está sendo expressa e sua função primordial é degradar a proteína supressora de tumor p53 (VANDE POL; KLINGELHUTZ, 2013). Como resultado da degradação desta proteína, há o acúmulo de células com alterações genômicas, sendo pouco provável que o DNA plasmidial seja derivado da apoptose (SATHISH et al.,2004b).

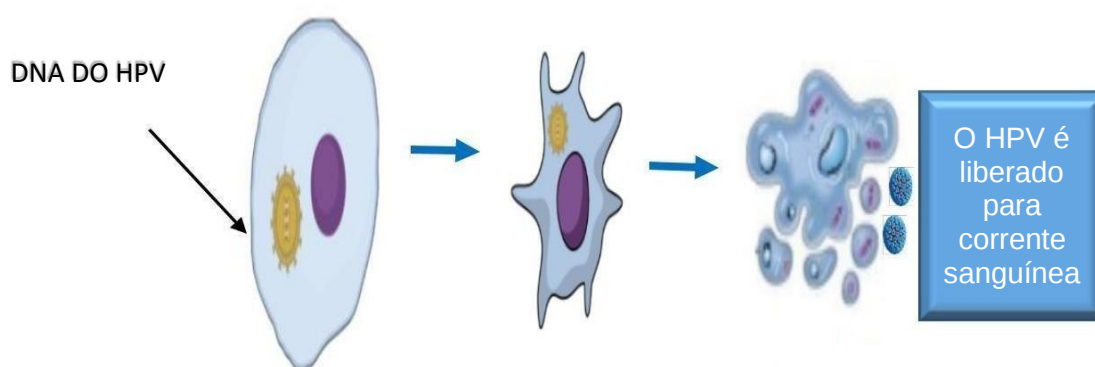


Figura 8: Hipótese de liberação do HPV para corrente sanguínea durante a apoptose.

Primeiramente, as células metastáticas infectadas pelo HPV devem se libertar do tumor primário e atingir a corrente sanguínea. Depois de atingir o sítio secundário, as células cancerosas saem da corrente sanguínea e colonizam o tecido secundário, assim o HPV infectaria outros sítios. Autoria própria.

A hipótese mais provável seria que o DNA plasmático não estaria ligado ao tumor, possuindo uma rota de disseminação hematogênica alternativa ainda desconhecida (BODAGHI et al., 2005c) (figura 9). A transmissão do HPV ocorre através do contato sexual. Aproximadamente 10,4% das mulheres sexualmente ativas do mundo apresentaram infecção por HPV em algum período da vida (Bruni L et al., 2016). Entretanto, a maior parte das novas infecções por HPV regredem espontaneamente entre seis a dezoito meses (DE SANJOSE et al., 2010). Esta regressão está associada a mecanismos imunológicos humorais e celulares (SANCLEMENTE; GILL, 2002b). No entanto, é possível que as células contendo HPV sejam transportadas através

da via hematológica a partir do local de entrada do vírus para outros sítios corporais, sem a necessidade de uma lesão prévia.

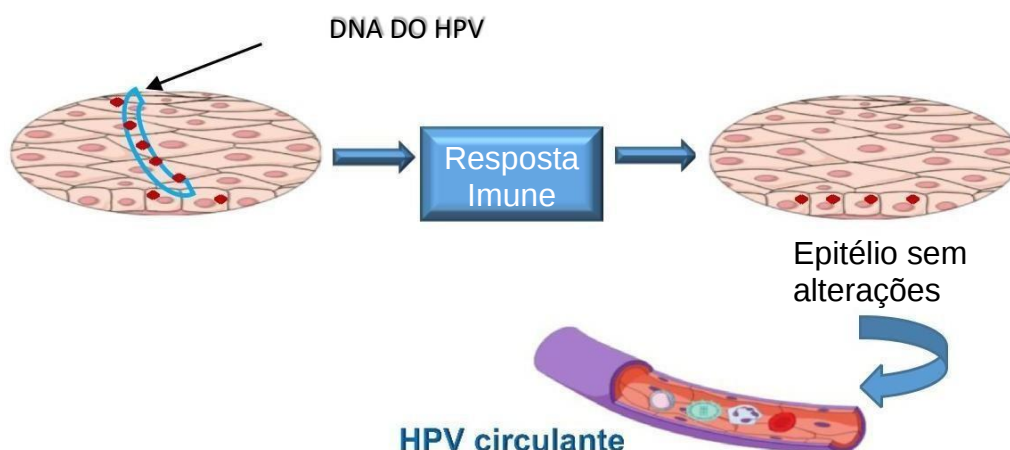


Figura 9. Hipótese de como o HPV é liberado na corrente sanguínea. Após infectar o epitélio cervical o HPV gera uma resposta imune. A infecção é sanada e a paciente não apresenta sinais clínicos, no entanto, o HPV é carregado para corrente sanguínea por células do sistema imune. Autoria própria.

2.2.3 Associação do HPV no sangue periférico e outros câncer

Infecções persistentes provocadas pelo Papilomavírus humano (HPV), concomitantemente com fatores ambientais e genéticos estão relacionados com o surgimento de lesões pré-neoplásicas e do câncer cervical (DE FREITAS et al., 2012; ZUR HAUSEN, 1996). O mecanismo carcinogênico desenvolvido pelo HPV no câncer de colo uterino tem sido bem descrito por diversos autores desde meados dos anos 80 (SCHIFFMAN et al., 2016; DOORBAR et al., 2012b; DOORBAR, 2005; ZUR HAUSEN, 1996).

No entanto, recentes estudos tem demonstrado a presença do DNA do HPV em outros sítios anatômicos como: vagina, pênis, mama, pulmão, pele, ânus (DE FREITAS et al., 2016; FREITAS et al., 2016; KHAN et al., 2016a; BUCCHI et al., 2016; CHRISTODOULIDOU et al., 2015; ALEMANY, 2014; BOSCH et al., 2013b; CARTER et al., 2001; DE SANJOSÉ et al., 2001).

Dentre os cânceres não cervicais, aproximadamente, 30%-80% dos casos de câncer de vagina, ânus, pênis e vulva são atribuídos a infecção por HPV (NGAMKHAM et al., 2016; BUCCHI et al., 2016; PLUMMER et al., 2016a; KHAN et al., 2016b; STOCKDALE, 2015). Entre os HR-HPV detectados nesses

sítios corporais o HPV 16 é o mais prevalente (BRUNI et al., 2016; PHANSRI, 2016; CHRISTODOULIDOU et al., 2015). O HPV 18 é o segundo tipo viral comumente detectado no câncer de pênis e ânus (ELORZA et al., 2016; DJAJADININGRAT et al., 2015; MOSCICKI et al., 2014; NYITRAY; IANNACONE, 2014b). Nos casos dos câncer vulva e vagina o segundos tipo viral mais comum são os HPVs 33 e 31, respectivamente (KHAN et al., 2016b; NGAMKHAM et al., 2016; SUH et al., 2016).

Além disso, já foi demonstrado a presença do DNA do HPV em sítios corporais anatomicamente distante do cervical, como por exemplo mama e pulmão. As taxas de detecção do DNA viral no câncer de pulmão pode variar entre 0%-76% (FREITAS et al., 2016; LI et al., 2011; PARK et al., 2007).

Enquanto que na mama a presença do DNA do HPV varia entre 25%-100% (DE LIMA et al., 2016; SIGAROODI et al., 2012; SIMÕES et al., 2012). Dentre os genótipos detectados nesses tecidos, o HPV 16 é o tipo mais frequente, seguido pelo HPV 18 (DE LIMA et al., 2016; FREITAS et al., 2016; VANNER; SHROYER, 2015; SIMÕES et al., 2012).

Estudos identificaram a presença de sequências do DNA do HPV no sangue periférico de pacientes com tumores primários de orofaringe, mama e pulmão (BLEOTU et al., 2010; CHIOU et al., 2003b; CAPONE et al., 2000). E os genótipos detectados na corrente sanguínea foram os mesmos detectados no tecido (HEDAU et al., 2011; CARTER et al., 2001).

Além disso, estudos correlacionam a agressividade do tumor e a presença do HPV na circulação sanguínea. Diante disso, um estudo realizado por CAPONE et al. (2000) demonstrou que pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço positivos para HPV no sangue apresentaram metástase e desenvolveram um tipo de tumor mais agressivo. Outro estudo demonstrou que as taxas de detecção do DNA do HPV na corrente sanguínea foi maior em pacientes com câncer de pulmão primário em estágio avançado (CHIOU et al., 2003).

Com base nos dados supracitados, existe uma necessidade de compreender o papel dos HPVs no sangue periférico como agentes etiológicos da carcinogênese mediada pelo HPV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Detectar e analisar a participação do sangue periférico no processo de infecção relacionado ao HPV.

3.2 Objetivos Específicos

1. Detectar e genotipar o DNA do HPV em amostras cervicais e sangue periférico de pacientes sem lesões cervicais, com lesões cervicais e com câncer cervical;
2. Realizar um estudo de associação entre os dados histopatológicos e a presença do DNA viral em sangue periférico.
3. Quantificar a carga viral das pacientes HPV 16 positivas em sangue periférico de pacientes saudáveis, com lesões cervicais e câncer cervical;
4. Avaliar o *status* físico do genoma viral em amostras HPV 16 positivas;

4. METODOLOGIA

4.1 Amostras biológicas

O presente estudo, de caráter transversal, foi realizado com pacientes da região metropolitana do Recife, Nordeste do Brasil. Foram coletadas 153 amostras de raspado cervical e de sangue periférico de pacientes com ou sem lesão cervical, atendidas de rotina no Hospital Oswaldo Cruz e no Hospital das Clínicas Pernambuco.

O grupo amostral deste estudo foi constituído por mulheres com idades entre 16 e 65 anos, todas sexualmente ativas. A duração das coletas que resultaram no presente estudo se estendeu entre Janeiro de 2011 a Dezembro de 2016. Além disso, foram coletados dados sociodemográficos e clínico de cada paciente, com o intuito de traçar o perfil dessas pacientes.

4.2 Critérios de Elegibilidade

As pacientes sexualmente ativas, brasileiras, foram elegíveis para este estudo. Após terem sido informadas sobre os objetivos do estudo, todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão para este estudo foram os seguintes: Pacientes portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e recusa da assinatura no TCLE.

4.3 Coleta de material biológico

A coleta de sangue foi realizada por punção periférica, utilizando-se tubos a vácuo (Vacutainer®), contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de raspado cervical foram coletadas durante a realização do exame pélvico com o uso de uma escova cervical apropriada (*Cytobrush*). O raspado cervical foi conservado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e armazenadas a -20°C, até a etapa posterior de extração do DNA viral. Além disso, outra coleta foi realizada para a análise da citologia oncológica. Para tal, as células esfoliadas foram distribuídas em lâminas, fixadas em álcool absoluto e coradas pelo método Papanicolaou. Em seguida, procedeu-se a leitura das lâminas pelos Patologistas de cada serviço de saúde acima mencionados. Os resultados foram registrados de acordo com a classificação do Sistema Bethesda.

4.4 Extração do DNA

O DNA do raspado cervical e sangue periférico foram extraídos utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, todas as amostras foram quantificadas utilizando um espectofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer).

A qualidade do DNA foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando um fragmento do gene da β -globina, utilizando os *primers* descritos na Tabela 3. As condições da PCR foram as seguintes: 95°C durante 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C; e extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em um gel de agarose 2% e corado em brometo de etídio.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos.

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)
β-globina		
PC04	ACACAAC T GTGTTCACTAGC	110pb
GH20	CAACTTCATCCACGTT C ACC	
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450pb
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	110pb
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA	
E6 HPV-16		
Senso	GAGAAACTGCAATGTTTCAGGACC	81pb
Anti-senso	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC	
E2 HPV-16		
Senso	AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG	76pb
Anti-senso	CCAAGGCGACGGCTTTG	

4.5 Detecção do DNA viral e genotipagem

A presença do DNA do HPV foi verificada na corrente sanguínea e na cérvix, pela amplificação com dois conjuntos de oligonucleotídeos. A primeira etapa foi realizada com o conjunto de *primers* concenso e degenerados MY09

e MY11 (Tabela 3), que anelam em uma região conservada do gene L1, amplificando um produto de aproximadamente 450pb. Posteriormente, foram realizadas Nested-PCRs, utilizando os oligonucleotídeos GP5 e GP6, gerando um fragmento de aproximadamente 140 pb. As condições da PCR para os *primers* GP5/6 foram as seguintes: denaturação inicial por 5 minutos a 94°C; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 44°C, 1 minuto e meio a 72°C; e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio. Amostra de DNA HPV-positiva oriundas de pacientes com câncer cervical e o genoma clonado do HPV16 foram utilizadas como controles positivo em todas as reações de PCR. Além disso, todos os testes foram realizados em triplicatas.

As amostras positivas no sangue e na cérvix para o DNA do HPV foram tipificadas por sequenciamento. Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®, CA, USA ®). O sequenciamento das amostras foi realizado na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Análise de Expressão Gênica, Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade.

As sequências resultantes foram analisadas utilizando o pacote Standen (STANDEN, 1996) com os programas Gap4 (versão 4.0) e Pregap4 (versão 1.5), os quais foram utilizados para a construção dos *contigs* das sequências obtidas de DNA dos HPV. Após a montagem dos *contigs*, foi utilizado o programa BLAST, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para a comparação com sequências HPV previamente conhecidas.

4.6 Status físico e carga viral

Visando determinar o *status físico* e carga viral das pacientes HPV16-positivas, foram realizadas PCRs em tempo real (qPCR) utilizando o sistema Sybr Green. A amplificação foi realizada no volume de 20µl, contendo 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e oligonucleotídeos que amplificam regiões de E6 e E2 de HPV-16 (tabela 3) a 300nM. As reações

foram realizadas no aparelho Agilent Real-Time PCR e Cyclor 8800 (Agilent Technologies ®). A reação foi submetida a um ciclo inicial de 2 minutos a 50°C, seguido de um ciclo de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e 50 ciclos com duas etapas de 95°C durante 15s, e 60°C durante 60s (adaptado de Peitsaro et al., 2002).

Uma série de diluições (10^1 a 10^6) do genoma completo de HPV-16 clonado no vetor pBR-322 foi utilizada para gerar a curva padrão, servindo como um padrão para curvas de calibração para os genes E2 e E6. Também foram utilizadas como controle positivo das reações o DNA extraído das linhagens celulares CaSki (400–6000 cópias por célula) e SiHa (1-2 cópia por célula), usadas para controlar a precisão e reprodutibilidade das curvas padrão estimadas para carga de HPV. Uma vez construídas curvas de calibração para cada gene, as amostras foram analisadas em duplicata.

A carga viral foi determinada a partir dos níveis do gene E6 presente tanto nas amostras do grupo caso, quanto do grupo controle. As cargas virais de cada amostra foram expressas como o número de cópias de E6 em 50ng de DNA (PEITSARO; JOHANSSON; SYRJÄNEN, 2002).

Quanto ao *status* físico, o vírus foi considerado integrado ao genoma do hospedeiro quando o gene E2 não foi detectado. Para diferenciar a forma epissomal da mista (quando há presença de ambas as formas, epissomal e integrado) foi calculado a razão E2/E6, onde a razão de E2/E6 <1 indica a forma mista, e valores >1 indicam predominância da forma epissomal (PEITSARO; JOHANSSON; SYRJÄNEN, 2002).

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas para estimar a associação entre os dados histopatológicos e a presença do DNA viral em sangue periférico, com aplicação do teste Odds Ratio (OR). O teste qui quadrado foi realizado para comparar os grupos de caso e controle. Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma v5.0.

4.8 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de ética e Pesquisa do Complexo hospitalar da Universidade de Pernambuco (CAAE: 0058.0.106.000- 10, HUOC/PROCAPE 64/2010) e da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE sob o CAAE: 09307612.8.0000.5208). Todas as pacientes que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5. RESULTADO

5.1 Características da população estudada

Foram analisados nesse estudo 153 amostras de escovado cervical e sangue. Destes, 85 pacientes apresentaram citologia normal, que foram classificados como o —*grupo controle*. As 68 amostras restantes foram denominadas de —*grupo caso*. A análise citológica mostrou que dentre as pacientes incluídas no grupo caso, 43 apresentaram *lesão de baixo grau* (LSIL) e 25 lesões de alto grau (HSIL).

5.2 Prevalência da infecção por HPV no sangue periférico e na região cervical

Visando avaliar a qualidade do DNA extraído das amostras, foram realizadas PCRs que amplificam o gene β -globina. Na figura 10 podemos observar o produto amplificado do gene da β -globina, mostrando a viabilidade das amostras de escovado cervical. Na figura 11 podemos observar o produto amplificado do gene da β -globina, mostrando a viabilidade das amostras de sangue.

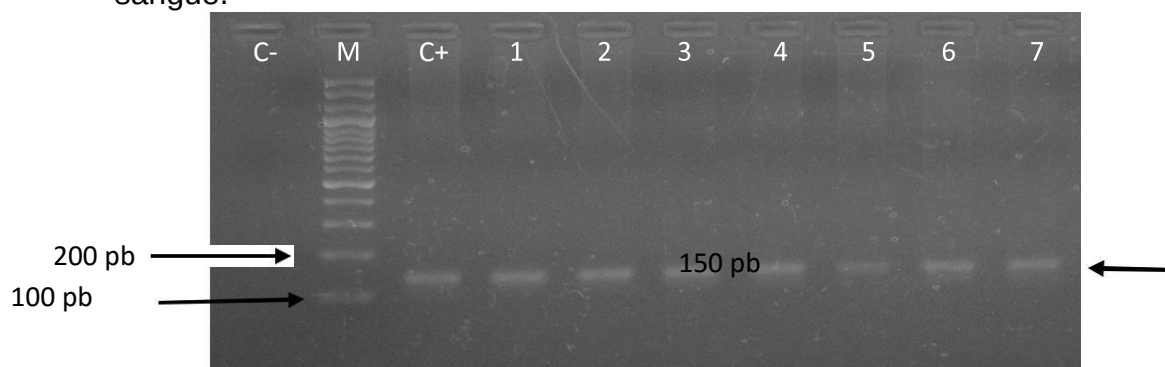


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos amplificados para o gene da β - globina. M: marcador molecular de 1000pb (Promega®); C-: controle negativo (amostra livre de DNA); C+: controle positivo (genoma do HPV clonado em pGEM); 1-7: amostras de sangue periférico.

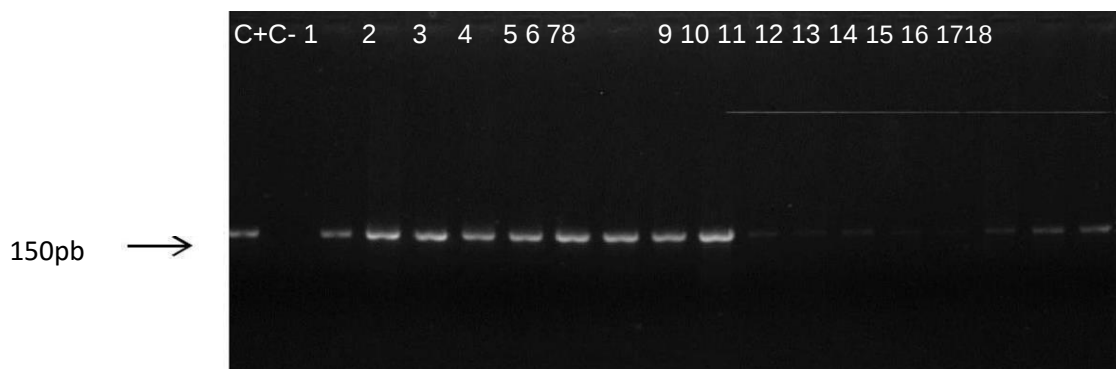


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos amplificados para o gene da β - globina. C-: controle negativo (amostra livre de DNA); C+: controle positivo (genoma do HPV clonado em pGEM); 1-18: amostras de sangue periférico.

A presença do DNA do HPV na região cervical foi avaliada nas 153 pacientes, a partir da amplificação da região conservada do gene L1, utilizando os *primers* MY 09/11. Deste total, 43% (66/153) foram positivas para o DNA do HPV (Gráfico 1).

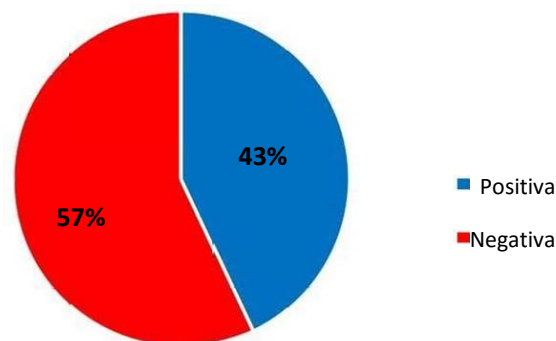


Gráfico 1. Prevalência do DNA do HPV na região da cérvix de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil. Em uma população de 153 pacientes, foi observada prevalência de 43% (66/153) do DNA do HPV em amostras do rapado cervical.

Com relação à presença do DNA do HPV em sangue periférico, as 153 amostras de sangue submetidas a PCR, utilizando os iniciadores MY 09/11, não amplificaram (0/153). Portanto, as amostras foram submetidas à técnica *nested*-PCR com iniciadores GP5/GP6, a partir desse protocolo o DNA do HPV foi detectado na corrente sanguínea em 47% (72/153) das amostras (Gráfico2).

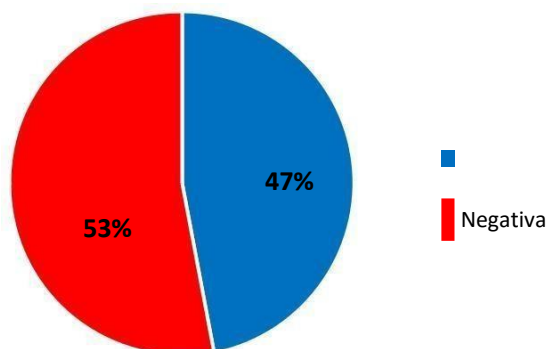


Gráfico 2. Prevalência do DNA do HPV em amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil. Em uma população de 153 pacientes, foi observada prevalência de 47% (72/153) do DNA do HPV em amostras de sangue periférico.

Quanto aos tipos de HPVs presentes na região cervical estudadas foram observados onze tipos virais: HPV16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 70, HPV 6, HPV 11, HPV 61, HPV 81.

Quanto aos tipos de HPVs presente no sangue periférico das pacientes estudadas, foram observados cinco tipos virais: HPV16 48% (35/72), HPV18 32% (23/72), HPV33 13% (9/72), HPV58 5,4% (4/72) e o HPV66 1,8% (1/72) (Gráfico 3).

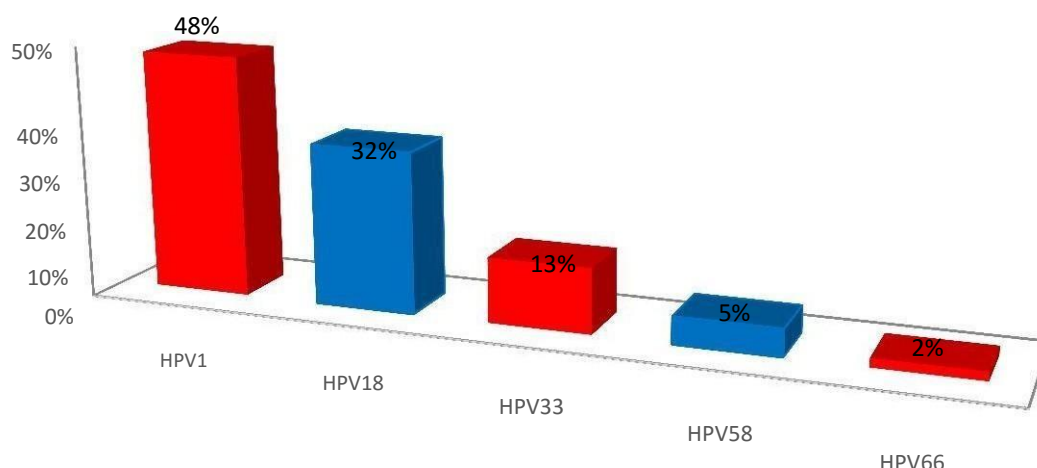


Gráfico 3. Distribuição dos HPVs detectados em amostras de sangue periférico de pacientes oriundas da Região Nordeste do Brasil. Os HPVs 16, 18, 33, 58, e 66 foram os cinco genótipos detectados na população estudada.

Em relação aos tipos de HPVs presentes na região cervical estudadas foram observados onze tipos virais: HPV16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 70, HPV 6, HPV 11, HPV 61, HPV81.

Com o objetivo de associar a presença do vírus na corrente sanguínea com o grau da lesão cervical. Observamos que 61% (44/72) das pacientes HPV positiva no sangue periférico não apresentavam lesão cervical ou qualquer alteração na cérvix no momento da coleta e 39% (28/72) apresentavam lesões pré-neoplásicas ou câncer cervical. Quando estratificamos os dados

para avaliar que tipo de lesão estava presente nessas pacientes portadoras do HPV no sangue, observou-se que: 2,7% (2/72) apresentaram condiloma; 17% (12/72) tinham lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL); 8% (6/72) apresentaram lesão intraepitelial de alto grau (HSIL); 10% (7/72) tinham câncer cervical escamoso; 1,3% (1/72) apresentaram adenocarcinoma (Gráfico 4). Apesar disso, não foi estaticamente significativo ($p = 0.6746$; OR = 0,5769) a relação entre a presença do vírus no sangue e o grau da lesão, demonstrando que a lesão cervical não é fator necessário para a detecção do vírus na corrente sanguínea (Tabela 4).

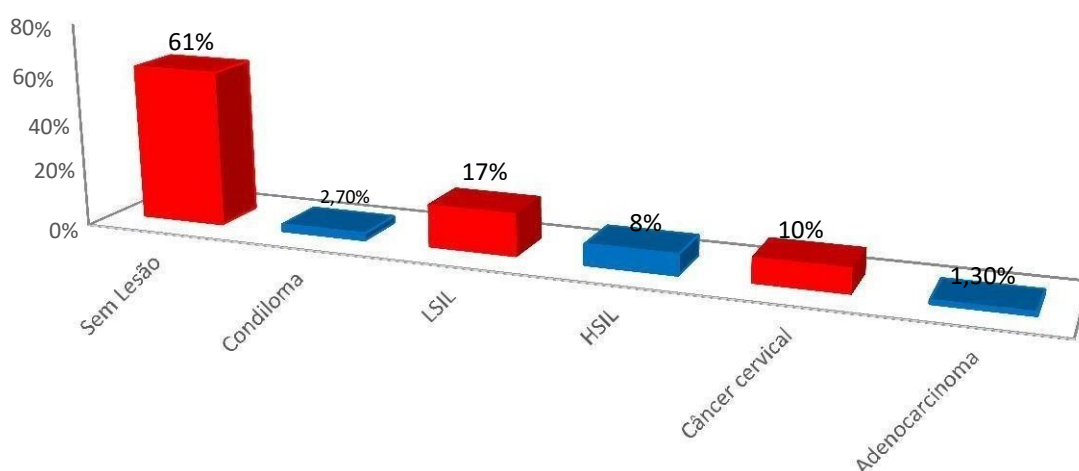


Gráfico 4. Análise citológica da região cervical das pacientes positivas para o DNA do HPV em sangue periférico. Em um total de 72 amostras cervicais foi realizada a análise citológica da região cervical. Foi observado pacientes sem lesão, com condiloma, adenocarcinoma, LSIL, HSIL e câncer cervical invasivo.

Quando comparado à presença do DNA viral no sangue e na cérvix, foi observado: que 31% (48/153) das amostras não apresentavam DNA do HPV em ambos os sítios; 22% (33/153) das amostras apresentavam a presença do DNA viral no sangue e na cérvix; 22% (33/153) das pacientes apresentaram o DNA do vírus apenas na cérvix e 25% (39/153) apresentou a presença do DNA do HPV apenas no sangue (Gráfico 5).

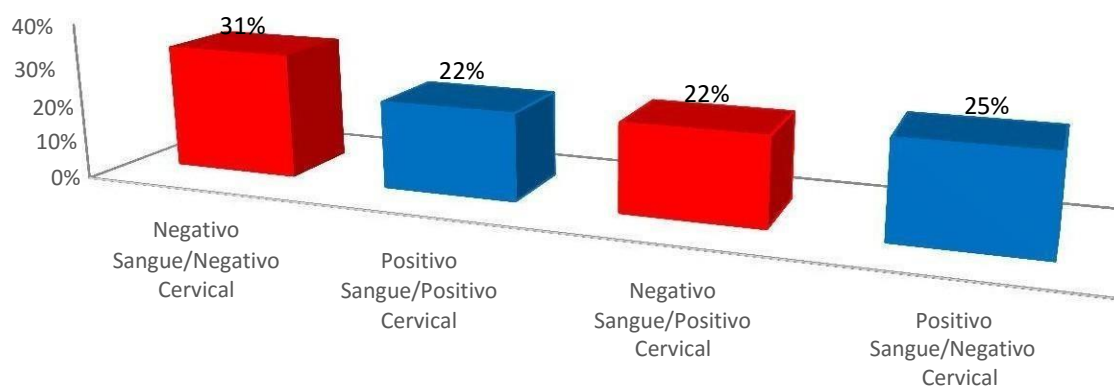


Gráfico 5. Comparação da presença do vírus na região cervical e sangue periférico de mulheres oriundas da região metropolitana de Recife, Pernambuco. No total, foram observadas amostras negativas para o DNA do HPV na região cervical e sangue periférico; positivo na região cervical e sangue periférico; negativo no sangue e positivo na região cervical e; positivo no sangue e negativo na região cervical.

Considerando os tipos de HPVs presentes nos dois sítios pesquisados, foi observado um percentual de 55% das pacientes apresentaram o mesmo tipo de HPV na região cervical e no sangue periférico. Por outro lado, 45% das pacientes apresentaram tipos de HPV no sangue diferentes dos observados na cérvix (Gráfico 6). No presente estudo, não foi possível avaliar se o HPV presente na região cervical e no sangue periférico se tratava de uma mesma variante, pois os eletroferogramas obtidos nos sequenciamentos permitiram apenas distinguir os tipos.

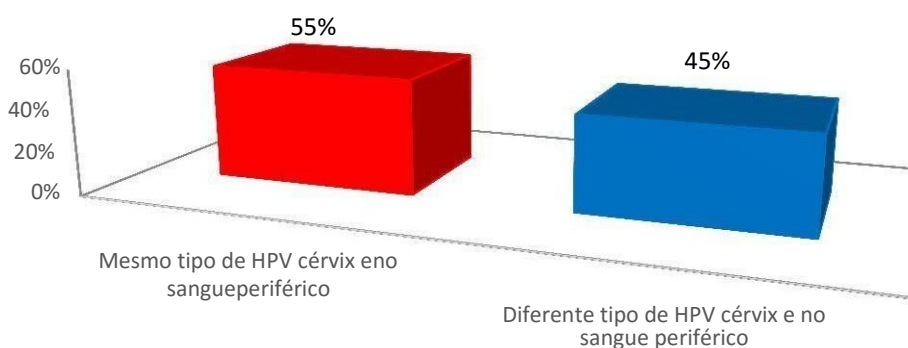


Gráfico 6. Tipos de HPV presente na cérvix e no sangue periférico. Do total das amostras positivas para o DNA do HPV na cérvix e sangue periférico, 55% apresentaram a contaminação pelo mesmo tipo de HPV, enquanto 45% apresentaram tipos distintos.

Além disso, foi realizada uma análise da possível relação entre os fatores sociodemográficos, dados clínicos e a presença do DNA do HPV no sangue. No entanto, a associação não foi estatisticamente significativa entre as variáveis e a presença do vírus no sangue periférico (Tabela 4).

Entretanto, houve associação significativa quando comparado à presença do vírus na região cervical com a presença do vírus na corrente

sanguínea ($p = 0,0002$ OR= 0,1615), especulamos que a presença do DNA do HPV na cérvix é condição necessária para a presença do HPV no sangue (Tabela 4).

Tabela 4. Análise univariada da associação entre variáveis sócio-demográficas e clínicas e a detecção viral na corrente sanguínea.

	TODOS OS CASOS N(%)	HPV- NEGATIVO N(%)	HPV-POSITIVO N(%)	χ^2	p-value	Odds Ratio (OR)
Número de casos	153 (100%)	81 (52,94%)	72 (47,05%)			
Parceiro sexuais						
Apenas 1	71 (100%)	38 (53,52%)	33 (46,47%)	1,064	0,8304	1,2
+ 2 parceiros	82 (100%)	43 (52,43%)	39 (47,56%)			
Estado Civil						
Solteira	45 (100%)	25 (55,55%)	20 (44,44%)	0,9061	0,8338	0,8558
Casada	101 (100%)	55 (54,45%)	46 (45,54%)			
Divorciada	1 (100%)	0 (100%)	1 (100%)			
Viúva	6 (100%)	1 (16,66%)	5 (83,33%)			
Uso de contraceptivos orais						
Sim	27 (100%)	18 (66,66%)	9 (33,33%)	0,777	0,1551	0,4375
Não	126 (100%)	63 (50,0%)	63 (50,0%)			
Uso de cigarro						
Sim	32 (100%)	17 (53,12%)	15 (46,87%)	1,137	0,6753	1,296
Não	121 (100%)	64 (52,89%)	57 (47,10%)			
Presença do vírus na cérvix						
Sim	66 (100%)	33 (50%)	33 (50%)	0,5741	0,0002	0,1615
Não	87 (100%)	48 (55,17%)	39 (44,82%)			
Tipo histológico						
LSIL	27 (100%)	18 (66,6%)	9 (33,3%)	1,094	0,6916	1,182
HSIL	8 (100%)	2 (25,0%)	6 (75,0%)			
Condiloma	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)			
Câncer	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)			
Adenocarcinoma	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)			

P<0.05 = estatisticamente significante

5.3 Avaliação da carga viral e do *status* físico do vírus em sangue periférico

As cargas virais de cada amostra foram expressas como o número de cópias absolutas de E6 de HPV 16 em 50 ng. O *status* físico do vírus foi determinado através da quantificação do gene E2. A perda de E2 é um indicativo que o DNA do HPV está integrado no genoma do hospedeiro. O estado de integração é fundamental para iniciação da replicação viral.

Para a determinação da carga viral e do *status físico* do vírus no sangue periférico foi avaliado através da curva de eficiência dos *primers* E6 e E2 utilizando o modelo de regressão linear, mostrando coeficientes de correlação $R^2 = 0,99$ e valores de eficiência do iniciador (E) de 101 conforme recomendado (Figura12).

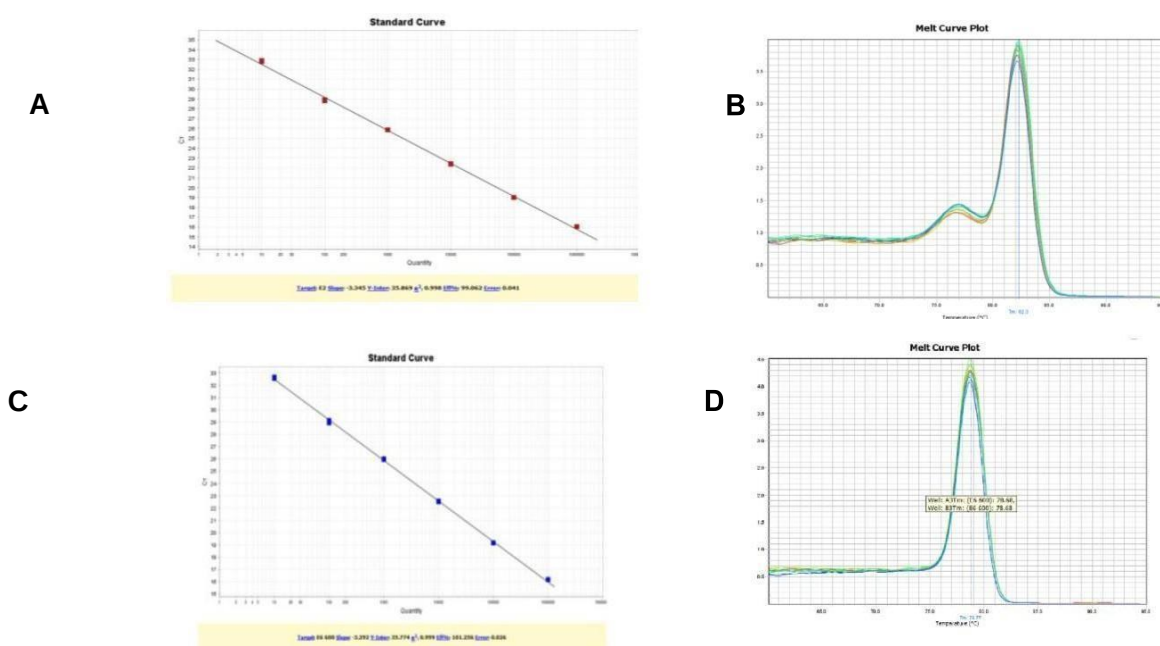


Figura 12. Eficiência dos primers e curva de *melting* dos genes E2 e E6 do HPV16. A eficiência do *primer* E2 foi avaliada através da regressão linear (A). A especificidade do *primer* E2 foi demonstrada através de um único pico na curva de melting (B). A eficiência do *primer* E6 foi avaliada através da regressão linear (C). A especificidade do *primer* E6 foi demonstrada através de um único pico na curva de melting(D).

Das amostras de sangue HPV16 positivas, selecionamos 17 amostras derivadas de pacientes com diferentes graus de lesões precursoras e de câncer cervical, e 27 amostras eram de pacientes saudáveis (sem lesão cervical) (Tabela 5 e6).

A carga viral variou de 0,31 a 801,5 cópias absolutas de E6, a média da carga viral foi 52,26 cópias de E6, em pacientes com lesão cervical, já em pacientes sem histórico de lesões intraepiteliais cervicais e câncer cervical a carga viral variou de 1,63 a 405,51 cópias absolutas de E6, a média da carga viral foi 61,20 cópias de E6. Curiosamente, a carga viral foi predominantemente mais elevada nas pacientes com citologia negativa.

Tabela 5. Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do *status* físico em amostras com diferentes tipos de lesão cervical e câncer cervical.

Amostras	Quantificação de E2 em 50 ng	Quantificação de E6 em 50 ng	Status Físico	Clínica
6	3,084	17,12	Misto	NIC III
9	2,64	4,38	Misto	NIC III
16	2,815	4,381	Misto	Câncer
30	11,7	3,65	Epissomal	NIC II
42	2,05	9,47	Misto	Adeno
47	3,56	3,91	Misto	NIC I
61	22,38	4,21	Epissomal	Câncer
67	5,75	4,09	Misto	NIC II
69	14,06	5,05	Misto	NIC I
92	0,27	0,31	Misto	Câncer
101	0	801,5	Integrado	Câncer
102	3,4	0,71	Epissomal	NIC II
116	46,52	7,15	Epissomal	NIC I
117	17,11	2,75	Epissomal	Câncer
130	4,03	2,64	Misto	NIC II
136	25,76	9,87	Epissomal	Condiloma
137	4,22	7,31	Misto	NIC I
SiHa	145,09	422559,33	Integrado	
CasKi	48388290,06	35023354,43	Misto	

Tabela 6. Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do *status* físico em pacientes sem histórico de lesão cervical.

Amostras	Quantificação de E2 em 50 ng	Quantificação de E6 em 50 ng	Status Físico	Clínica
51	28,73	27,8	Misto	Sem lesão
52	6,16	21,58	Misto	Sem lesão
58	14,14	34,89	Misto	Sem lesão
62	3,74	8,52	Misto	Sem lesão
63	13,89	7,6	Misto	Sem lesão
64	0,53	46,47	Integrado	Sem lesão
74	5,80	2,76	Epissomal	Sem lesão
75	10,52	17,24	Misto	Sem lesão
91	21,94	11,69	Misto	Sem lesão
115	8,47	33,121	Misto	Sem lesão
122	3,61	479,6	Integrado	Sem lesão
125	10,15	10,37	Misto	Sem lesão
126	2,05	23,06	Integrado	Sem lesão
131	7,09	5,75	Misto	Sem lesão
132	24,20	60,35	Misto	Sem lesão
152	7,08	16,03	Misto	Sem lesão
153	24,32	10,6	Epissomal	Sem lesão
156	17,48	10,21	Misto	Sem lesão
157	1,45	9,06	Misto	Sem lesão
158	16,51	83,89	Misto	Sem lesão
168	16,94	305,03	Integrado	Sem lesão
170	20,82	9,92	Epissomal	Sem lesão
171	0,42	1,72	Misto	Sem lesão
172	29,60	3,47	Epissomal	Sem lesão
173	0,41	1,63	Misto	Sem lesão
174	29,98	4,78	Epissomal	Sem lesão
175	0,00	405,51	Integrado	Sem lesão
SiHa	101,50	374264,73	Integrado	
Caski	48556268,24	29892754,03	Misto	

Em relação ao *status* físico do vírus ambos os grupos apresentaram predominância da forma mista (epissomal e integrado). Foi considerada a razão de E2/E6 <1 como indicativo da forma mista. Nas pacientes com alterações no citológico, 58,82% (10/17) estavam na forma mista, 35,29% (6/17) na forma epissomal e 5,88% (1/17) estavam na forma integrada. Bem como, nas pacientes do grupo controle 62,96% (17/27) estava na forma mista, 18,51% (5/27) estava na forma epissomal e 18,51% (5/27) apresentaram-se na

forma integrada. No entanto não foi observada relação entre o grau da lesão com o *status* físico e a carga viral ($p = 0,4098$; $p = 0,6335$ respectivamente).

6. DISCUSSÃO

Os papilomavírus, embora descritos como vírus epiteliotrópicos ou mucosotrópico, ou seja, possuem tropismo para epitélio e mucosa, sua presença também em sangue e outros sítios não epiteliais (Lowy and Schiller 2012). Nesse estudo, foi verificada a presença do HPV em sangue periférico de mulheres do estado de Pernambuco, Brasil.

Os resultados desse estudo mostraram a prevalência de 47% (72/153) do DNA do HPV no sangue periférico de mulheres com câncer cervical, com alterações pré-neoplásicas e pacientes sem lesão cervical. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, que observaram taxas de detecção viral no sangue periférico variando entre 6%-65%. (GNANAMONY et al., 2010; HO et al., 2005b; BODAGHI et al., 2005c; SATHISH et al., 2004b; WIDSCHWENDTER et al., 2003b, 2003b; PORNTANAKASEM et al., 2001c).

As discrepâncias nesses resultados podem estar relacionadas com: o método de extração e análise do DNA, bem como com os oligonucleotídeos utilizados.

Posteriormente, as amostras HPV-positivas no sangue foram sequenciadas com o objetivo de identificar quais os genótipos presentes na população estudada. Foram detectados cinco tipos de HPV (16, 18, 33, 58 e 66), sendo os tipos 16 e 18 mais prevalentes nas amostras avaliadas. Esse resultado encontrado no sangue corrobora com estudos anteriores (GNANAMONY et al., 2010; BODAGHI et al., 2005a; HO et al., 2005b; PORNTANAKASEM et al., 2001d).

As amostras cervicais foram sequenciadas com o objetivo de identificar os genótipos presentes na população estudada. Foram detectados onze tipos virais na região cervical (HPV16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 70, HPV 6, HPV 11, HPV 61, HPV 81). Curiosamente, os tipos virais mais detectados na região cervical desse grupo amostral, foram os HPVs 16 e 31, além disso o HPV18 aparece como quarto mais prevalente.

A alta frequência do HPV 18 em sangue periférico e sua baixa detecção nas amostras cervicais estudadas levanta vários questionamentos, como: i) a alta frequência do HPV18 em sangue periférico pode ser o resultado de uma

competição entre os genótipos 18 e 31 na região cervical; ii) o HPV16 e HPV18, circulante em sangue periférico, pode ser uma fonte alternativa de contaminação para outros sítios corpóreos, tais como mama, pulmão, e cabeça e pescoço; iii) o HPV18 encontrado em sangue periférico pode ser o mesmo tipo e variante encontrado em amostras de câncer de pulmão e câncer de mama, conforme detectados pelo nosso grupo de pesquisa (DE LIMA, 2016; AMARAL, 2015), que também avaliou paciente de Pernambuco. Entretanto, são necessários estudos complementares a fim de esclarecer o papel desse vírus em sangue periférico.

Associando a presença do DNA viral com o grau da lesão, a maioria das pacientes, 61% não tinha lesão cervical ou se quer relataram qualquer tipo de queixa clínica no momento da coleta, enquanto que 39% foram diagnosticadas com câncer cervical ou apresentaram algum tipo lesão. Entretanto, essa associação não foi estatisticamente significativa ($p= 0.6916$), demonstrando que a lesão cervical não é um fator necessário para a presença do DNA viral na corrente sanguínea. Apesar disso, quando comparamos presença do vírus na região cervical com a presença do vírus na corrente sanguínea, observamos uma associação ($p= 0.0002$), supomos que a presença do vírus na cérvix como fator necessário para a detecção do vírus no sangue.

Com base nisso, espera-se que o vírus ao entrar em contato com o epitélio cervical gere uma resposta imune predominantemente linfocitária. A partir daí a infecção seria sanada e a paciente não apresentaria queixas clínicas, no entanto, por alguma desordem no sistema imunológico ou outros fatores desconhecidos, o vírus atinge a corrente sanguínea tornando-se um meio de latência e propagação viral. Dessa forma, o vírus poderia infectar outros sítios corpóreos nos quais o HPV possa replicar e subsequentemente se integrar ao genoma do hospedeiro.

Apesar de detectar o HPV no sangue periférico, esse fator não é suficiente para estabelecer uma relação entre causa e efeito. Na literatura foi observado que a carga viral pode ser um fator para persistência e progressão neoplásica do câncer de colo do útero (PEITSARO et al. 2002). Sabe-se que uma cópia do genoma de HPV por célula é suficiente para transformação neoplásica (WILLIAMS et al., 2011b).

Foram avaliados por qPCR 17 amostras com algum tipo de alteração citológica (grupo caso) e 27 de amostras sem nenhuma alteração (grupo controle). A carga viral foi determinada pela quantidade de E6 de HPV16 em 50 ng. A média do número de cópias, curiosamente, foi maior em pacientes sem lesão, sendo de 52,26 cópias no grupo caso e 61,20 cópias no grupo controle. Era esperado que a carga viral do HPV em amostras do grupo controle fosse menor do que no grupo caso. Porém, até o momento, esse é o primeiro estudo que demonstra carga viral no sangue periférico de pacientes sem lesão cervical. DONG e colaboradores (2002b), apesar de não avaliarem grupo controle, detectaram alto número de cópias de HPV carga viral em pacientes com NIC I (116,5 cópias), NIC II (3518.5 cópias) e NIC III (100.000 cópias). Outros estudos, também obtiveram resultados expressivos avaliando a carga viral de pacientes com lesões de alto grau, GNANAMONY e colaboradores (2010) identificaram carga viral com média de 253 cópias/ul e HO et al., 2005 detectou carga viral com média de 586 cópias/ul.

O estado de integração é fundamental para iniciação da replicação viral. Um indicativo que o DNA do HPV está integrado no genoma do hospedeiro é a perda de E2. Portanto, foram realizadas quantificações absolutas do gene E2, visando determinar o *status* físico do genoma viral em amostras de pacientes do grupo controle e do grupo caso. Ambos os grupos, apresentaram predominância da forma mista (integrada e episomal), sendo 58,82% do grupo caso e 62,96% do grupo controle. Nossos resultados contrastam com os resultados de PORNTHANAKASEM et al., 2001c que encontrou predominância da forma integrada e de BODAGHI et al., 2005b que encontrou predominância da forma episomal.

A presença do vírus na forma mista e com elevada carga viral em pacientes sem lesão cervical reforça a hipótese que o vírus é carregado por alguma célula sanguínea, além disso, como foi demonstrado anteriormente no nosso estudo, a presença de lesão cervical não é fator necessário para a presença do vírus na corrente sanguínea, mas a presença do vírus na região cervical parece ser condição para a presença do vírus no sangue.

Embora o presente estudo tenha mostrado a presença do DNA de HPV no sangue de pacientes sem lesão cervical e com lesão cervical e que na maioria dos casos o DNA viral estava na forma mista ao genoma do hospedeiro

e com a carga viral elevada, não se pode afirmar o papel exato do sangue no processo carcinogênico provocado pelo HPV. Assim, são necessários novos estudos para melhor compreensão do papel do sangue na infecção gerada pelo HPV. Uma vez bem elucidado o papel do HPV no sangue, a presença do vírus na corrente sanguínea, poderia ser uma alternativa simples e minimamente invasiva de detecção precoce do câncer cervical e diversos cânceres onde acredita-se que o HPV tenha envolvimento.

7. CONCLUSÕES

- 1- Pela primeira vez no nordeste do Brasil foi detectado o DNA de HPV em amostra de sangue periférico. A taxa de detecção no sangue encontrada em nosso estudo foi de 47%. O presente estudo detectou a presença de 5 genótipos virais no sangue periférico, HPVs 16, 18, 33, 58 e 66, sendo o HPV16 (48%) mais prevalente, seguido pelo HPV18(32%).

A taxa de detecção do DNA do HPV em amostras cervicais foi de 43%. Quanto aos tipos de HPVs presentes na região cervical estudadas foram observados onze tipos virais: HPV16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 58, HPV 70, HPV 6, HPV 11, HPV 61, HPV81.

Especulamos que a presença do DNA na região cervical é um fator necessário para a detecção do vírus no sangue;

- 2- Quando foi comparado o grau da lesão e a presença do DNA do HPV na corrente sanguínea, não foram encontradas associação estatisticamente significativa($p>0.05$);
- 3- Foi identificada uma média de 52,26 cópias absolutas de E6 em pacientes com diferentes níveis de alteração e câncer cervical, e de 61,20 cópias absolutas de E6 em pacientes saudáveis;
- 4- O *status* físico predominante nas amostras analisadas foi a forma mista, presente tanto nas amostras com alterações pré-neoplásicas e câncer cervical, como também, nas amostras de pacientes saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ALP AVCI, G. [Genomic organization and proteins of human papillomavirus]. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 46, n. 3, p. 507–515, jul. 2012.
- ALVAREZ-ROSETO, R. E. et al. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of high-risk HPV-infected women with HGSIL. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, n. 9, p. 688–694, dez. 2008.
- AMARAL, M.C.M, Avaliação da presença do Papilomavírus humano em tumores de pulmão, 2015. (TESE). UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
- AMARANTE, M. K.; WATANABE, M. A. E. The possible involvement of virus in breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 3, p. 329–337, 1 mar. 2009.
- BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 4, p. 1437–1443, 2009.
- BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 35–56, out. 2013.
- 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, 25 maio 2010.
- BERNARD, X. et al. Proteasomal Degradation of p53 by Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Relies on the Structural Integrity of p53 Core Domain. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25981, 27 out. 2011.
- BLEOTU, C. et al. Tracking down of laryngo-pharyngeal metastasis. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v. 69, n. 3, p. 153–163, set. 2010.
- BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, nov. 2005a.
- BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, nov. 2005b.
- BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, 1 nov. 2005c.
- BOSCH, F. X. et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, v. 31 Suppl 7, p. H1-31, 31 dez. 2013.

BOULET, G. et al. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 11, p. 2006–2011, 2007.

BRANDT, S. et al. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 6, p. 1390–1395, 1 jun. 2008.

BRANDT, S. et al. Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 202–209, mar. 2011.

BRUNI, L. et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 7, p. e453–e463, 1 jul. 2016.

BUCCHI, D. et al. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 33, p. 7415–7430, 7 set. 2016.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 169–174, out. 2013.

CAMPO, M. S. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 3–14, mar. 2003.

CAO, S.-M. et al. [Significance of cell-free Epstein-Barr virus DNA in monitoring prognosis of nasopharyngeal carcinoma]. **Ai Zheng = Aizheng = Chinese Journal of Cancer**, v. 22, n. 3, p. 302–306, mar. 2003.

CAPONE, R. B. et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus (HPV) DNA in the Sera of Patients with HPV-associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 11, p. 4171–4175, 1 nov. 2000.

CARTER, J. J. et al. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. **Cancer Research**, v. 61, n. 5, p. 1934–1940, 1 mar. 2001.

CARVALHO, C. DE et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Braz. j. microbiol**, v. 34, n. supl.1, p. 82–84, nov. 2003.

CHAGAS, B. S. et al. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132570, 15 jul. 2015.

CHEN, A. C.-H. et al. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 10, p. 1792–1796, 1 out. 2009.

CHEN, G.; STENLUND, A. The E1 Initiator Recognizes Multiple Overlapping Sites in the Papillomavirus Origin of DNA Replication. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 292–302, jan. 2001.

CHEN, X. S. et al. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. **Molecular Cell**, v. 5, n. 3, p. 557–567, 1 mar. 2000.

CHIOU, H.-L. et al. The presence of human papillomavirus type 16/18 DNA in blood circulation may act as a risk marker of lung cancer in Taiwan. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1558–1563, 15 mar. 2003.

CHISANGA, C. et al. Evidence for Placental HPV Infection in Both HIV Positive and Negative Women. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, n. 15, p. 1276–1289, dez. 2015.

CHRISTODOULIDOU, M. et al. Epidemiology of penile cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 39, n. 3, p. 126–136, jun. 2015.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. et al. The presence of human papillomavirus in semen does not affect the integrity of sperm DNA. **Andrologia**, 6 mar. 2017.

DAY, P. M. et al. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 14252–14257, 28 set. 2004.

DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology**, v. 126, n. 2, p. 304–311, ago. 2012.

DE FREITAS, A. C. et al. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2415–2427, dez. 2016.

DE LIMA, E. G. et al. Putative Mechanisms of Viral Transmission and Molecular Dysregulation of Mammary Epithelial Cells by Human Papillomavirus: Implications for Breast Cancer. **Current Molecular Medicine**, 5 ago. 2016.

DE LIMA, E. G. Avaliação da Existência de associação entre infecção por papilomavírus humano e câncer de mama. 2016. (TESE).
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet. Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010.

DE SANJOSÉ, S.; BRUNI, L.; ALEMANY, L. HPV in genital cancers (at the exception of cervical cancer) and anal cancers. **Presse Medicale (Paris, France: 1983)**, v. 43, n. 12 Pt 2, p. e423-428, dez. 2014.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.

DE VUYST, H. et al. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626–1636, 1 abr. 2009.

DENIS, F.; HANZ, S.; ALAIN, S. [Clearance, persistence and recurrence of HPV infection]. **Gynecologie, Obstetrique & Fertilité**, v. 36, n. 4, p. 430–440, abr. 2008.

DEPUYDT, T. et al. Human Papillomavirus (HPV) virion induced cancer and subfertility, two sides of the same coin. **Facts, Views & Vision in ObGyn**, v. 8, n. 4, p. 211–222, dez. 2016.

DONG, S. M. et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 1, p. 3–6, 1 jan. 2002a.

DONG, S. M. et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 1, p. 3–6, 1 jan. 2002b.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7–15, 1 mar. 2005.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–541, maio 2006.

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

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55–70, 20 nov. 2012b.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 166–179, 1 jan. 2016.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 2, p. 157–162, 20 mar. 2004.

FERNANDES, J. V.; ARAÚJO, J. M. G. DE; FERNANDES, T. A. A. DE M. **Biology and natural history of human papillomavirus infection**. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/biology-and-natural-history-of-human-papillomavirus-infection-peer-reviewed-article-OAJCT>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

FRATI, E. et al. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). **Infection, Genetics and**

Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, v. 11, n. 8, p. 2119–2124, dez. 2011.

FREITAS, A. C. DE et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 76–78, nov. 2003.

FREITAS, A. C. DE et al. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2415–2427, 1 dez. 2016.

GKOUNTELA, S.; ACETO, N. Stem-like features of cancer cells on their way to metastasis. **Biology Direct**, v. 11, p. 33, 2016.

GNANAMONY, M. et al. Detection and quantitation of HPV 16 and 18 in plasma of Indian women with cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 116, n. 3, p. 447–451, mar. 2010.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. e130828, 22 fev. 2015.

HALFON, P. et al. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia using the digene HPV genotyping LQ test. **Archives of Virology**, v. 158, n. 6, p. 1143–1149, jun. 2013.

HAUSEN, H. ZUR. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 9 out. 1996.

HEDAU, S. et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: No evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. **BMC Cancer**, v. 11, p. 27, 2011.

HEINO, P.; ZHOU, J.; LAMBERT, P. F. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. **Virology**, v. 276, n. 2, p. 304–314, 25 out. 2000.

HELLNER, K.; MÜNGER, K. Human Papillomaviruses As Therapeutic Targets in Human Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 13, p. 1785–1794, 1 maio 2011.

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. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 3, p. 615–621, dez. 2005a.

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. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 3, p. 615–621, 1 dez. 2005b.

- HOLMGREN, S. C. et al. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 3938–3948, abr. 2005a.
- HOLMGREN, S. C. et al. The Minor Capsid Protein L2 Contributes to Two Steps in the Human Papillomavirus Type 31 Life Cycle. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 3938–3948, abr. 2005b.
- HUGHES, F. J.; ROMANOS, M. A. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 25, p. 5817–5823, 25 dez. 1993.
- KAY, P. et al. Detection of HPV 16 and HPV 18 DNA in the blood of patients with cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 75, n. 3, p. 435–439, mar. 2005.
- KAYA, H. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas. **Pathologica**, v. 93, n. 5, p. 531–534, out. 2001.
- KHAN, M. J. et al. A Common Clinical Dilemma: Management of Abnormal Vaginal Cytology and Human Papillomavirus Test Results. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 20, n. 2, p. 119–125, abr. 2016a.
- KHAN, M. J. et al. A Common Clinical Dilemma: Management of Abnormal Vaginal Cytology and Human Papillomavirus Test Results. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 20, n. 2, p. 119–125, abr. 2016b.
- LEE, D. et al. Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. **Virus Research**, v. 52, n. 1, p. 97–108, nov. 1997.
- LEE, S.-J. et al. Both E6 and E7 Oncoproteins of Human Papillomavirus 16 Inhibit IL-18-Induced IFN- γ Production in Human Peripheral Blood Mononuclear and NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 497–504, 1 jul. 2001.
- LI, G. et al. Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1 α and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 311, n. 2, p. 160–170, 8 dez. 2011.
- LIU, V. W. et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 2, p. 269–272, ago. 2001a.
- LIU, V. W. et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 2, p. 269–272, ago. 2001b.
- LO, Y. M. et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. **Cancer Research**, v. 60, n. 24, p. 6878–6881, 15 dez. 2000.

LO, Y. M. Prognostic implication of pretreatment plasma/serum concentration of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 55, n. 7, p. 362–365, set. 2001.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 68, n. 2, p. 362–372, jun. 2004.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Reducing HPV-associated Cancer Globally. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 5, n. 1, p. 18–23, jan. 2012.

LU, J. Z. et al. Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7131–7139, dez. 1993.

MACHALEK, D. A. et al. Anal human papillomavirus infection and associated neoplastic lesions in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 5, p. 487–500, maio 2012.

MADELEINE, M. M. et al. Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 20, p. 1516–1523, 15 out. 1997.

MALECKA, K. A. et al. Identification and Characterization of Small Molecule Human Papillomavirus E6 Inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 7, p. 1603–1612, 18 jul. 2014.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out. 2013.

MCINTOSH, P. B. et al. E1–E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 16, p. 2810–2822, 15 ago. 2010.

MIRALLES-GURI, C. et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in penile carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 62, n. 10, p. 870–878, out. 2009.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 fev. 2003.

NAVARRO, M. G.-J. et al. Api5 Contributes to E2F1 Control of the G1/S Cell Cycle Phase Transition. **PLOS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71443, 8 jul. 2013.

NELSON, E. L.; BOGLIATTO, F.; STOCKDALE, C. K. Vulvar Intraepithelial Neoplasia (VIN) and Condylomata. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 58, n. 3, p. 512–525, set. 2015.

NGAMKHAM, J.; BOONMARK, K.; PHANSRI, T. Detection and Type-Distribution of Human Papillomavirus in Vulva and Vaginal Abnormal Cytology Lesions and Cancer Tissues from Thai Women. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 3, p. 1129–1134, 2016.

OKUN, M. M. et al. L1 interaction domains of papillomavirus l2 necessary for viral genome encapsidation. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4332–4342, maio 2001.

PAO, C. C. et al. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 95, n. 4, p. 540–546, abr. 1991.

PAO, C. C. et al. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 1008–1012, mar. 1997.

PARK, M. S. et al. The Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Korean Non-Small Cell Lung Cancer Patients. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 1, p. 69–77, 28 fev. 2007.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 886–891, mar. 2002.

PIROOZMAND, A. et al. The Association of High Risk Human Papillomaviruses in Patients With Cervical Cancer: An Evidence Based Study on Patients With Squamous Cell Dysplasia or Carcinoma for Evaluation of 23 Human Papilloma Virus Genotypes. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 4, 17 fev. 2016.

PORNTHANAKASEM, W. et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 1, n. 1, p. 2, 2001a.

PORNTHANAKASEM, W. et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC cancer**, v. 1, n. 1, p. 2, 2001b.

PORNTHANAKASEM, W. et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 1, p. 2, 5 mar. 2001c.

PORNTHANAKASEM, W. et al. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 1, p. 2, 5 mar. 2001d.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 138–168, out. 2013a.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 138–168, out. 2013b.

ROMBALDI, R. L. et al. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. **Virology Journal**, v. 6, p. 83, 2009.

ROPERTO, S. et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. **The Journal of General Virology**, v. 89, n. Pt 12, p. 3027–3033, dez.2008.

ROPERTO, S. et al. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2–3, p. 95–108, abr. 2010.

ROPERTO, S. et al. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 8, p. 1787–1794, 1 ago. 2011.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 16, n. 3, p. 231–240, maio 2002a.

SANCLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 16, n. 3, p. 231–240, maio 2002b.

SANTOS-LÓPEZ, G. et al. [General aspects of structure, classification and replication of human papillomavirus]. **Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social**, v. 53 Suppl 2, p. S166-171, 2015.

SATHISH, N. et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 204–209, nov.2004a.

SATHISH, N. et al. HPV DNA in plasma of patients with cervical carcinoma. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 204–209, 1 nov. 2004b.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 2, p. 16086, 01 2016.

SCHROEDER, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 1, p. 39–50, 23 dez. 2011.

SENBA, M.; MORI, N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. **Oncology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 17, 5 out. 2012.

SHIMADA, T. et al. Human Papillomavirus DNA in Plasma of Patients with HPV16 DNA-positive Uterine Cervical Cancer. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 5, p. 420–424, Maio 2010.

SIGAROODI, A. et al. Human papillomavirus is associated with breast cancer in the north part of Iran. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 837191,2012.

- SILVA, M. A. R. et al. The Presence and Gene Expression of Bovine Papillomavirus in the Peripheral Blood and Semen of Healthy Horses. **Transboundary and emerging diseases**, 4 dez. 2012.
- SILVA, M. A. R. et al. Detection and expression of bovine papillomavirus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 12, n. 3, p. 3150–3156, 2013.
- SILVA, M. A. R. et al. The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 4, p. 329–333, ago. 2014.
- SIMÕES, P. W. et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. **International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 22, n. 3, p. 343–347, mar.2012.
- STANLEY, M. A. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 15, n. 5, p. 663–676, out. 2001.
- STERLINKO GRM, H. et al. Inhibition of E6-induced degradation of its cellular substrates by novel blocking peptides. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 4, p. 971–985, 23 jan. 2004.
- SUH, D. H. et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2015. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 27, n. 6, p. e53, nov. 2016.
- THERIAULT, R. L.; THERIAULT, R. L. Biology of bone metastases. **Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 19, n. 2, p. 92– 101, abr.2012.
- TOMAIĆ, V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. **Cancers**, v. 8, n. 10, 19 out. 2016.
- 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. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1391–1396, maio 1999.
- UČAKAR, V. et al. Pre-vaccination prevalence of infections with 25 non-high-risk human papillomavirus types among 1,000 Slovenian women in cervical cancer screening. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 10, p. 1772–1779, 1 out. 2014.
- VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 115–137, out. 2013.
- VANNER, E. A.; SHROYER, K. R. Comments on —HPV and lung cancer risk: a meta-analysisll [Zhai et al., J. Clin. Virol. (in press)]. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 63, p. 91, fev. 2015.

- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 140, 11 nov. 2011.
- WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 175–186, out. 2013.
- WIDSCHWENDTER, A. et al. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker. **Cancer Letters**, v. 202, n. 2, p. 231–239, Dezembro2003a.
- WIDSCHWENDTER, A. et al. Human papillomavirus DNA in sera of cervical cancer patients as tumor marker. **Cancer Letters**, v. 202, n. 2, p. 231–239, dez. 2003b.
- WILLIAMS, V. M. et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future virology**, v. 6, n. 1, p. 45–57, 2011a.
- WILLIAMS, V. M. et al. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. **Future virology**, v. 6, n. 1, p. 45–57, 1 jan. 2011b.
- WILSON, V. G. et al. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes**, v. 24, n. 3, p. 275–290, jun. 2002.
- YAGUIU, A. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 7, n. 2, p. 487–497, 2008.
- YIM, E.-K. et al. Genomic and proteomic expression patterns in HPV-16 E6 gene transfected stable human carcinoma cell lines. **DNA and cell biology**, v. 23, n. 12, p. 826–835, dez. 2004.
- YIM, E.-K.; PARK, J.-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 37, n. 6, p. 319–324, dez. 2005.
- ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 9 mar. 2017.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55-78, 9 out. 1996.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, maio 2002.

ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/CCS/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil molecular associado à infecção pelo Papilomavirus Humano: identificação de novos marcadores moleculares e alvos terapêuticos.

Pesquisador: Antonio Carlos de Freitas

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 03606212.7.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 159.859

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Indicada na apresentação inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicada na apresentação inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicada na apresentação inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicada na apresentação inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicada na apresentação inicial.

Recomendações:

Indicada na apresentação inicial.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 30 de Novembro de 2012

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B- PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE



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

PROTOCOLO DE PESQUISA CEP-HUOC/PROCAPE

Protocolo CEP-HUOC/PROCAPE: 64/2010

CAAE: 0058.0.106.000-10

Local da pesquisa: HUOC

Setor: CEON – Centro de Oncologia

Pesquisador principal: MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ

Nome da pesquisa: Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBL2, TNFalfa e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Documentos recebidos:

- (x) Folha de rosto
- (x) Projeto de pesquisa com CD
- (x) Termo de Ciência e Aprovação
- (x) Carta de Anuência
- (x) Termo de Confidencialidade
- (x) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE
- (x) Orçamento financeiro
- (x) Cronograma
- () Pendências solicitadas pelo relator
- () Brochura do Investigador
- () Emenda(s)
- () Efeito(s) adverso(s)
- () Relatório parcial
- () Relatório atualizado
- () Relatório final

Recebido em: 30/04/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP / HUOC / PROCAPE / UPE
RECEBIMENTO 30/04/10
Ass. Muniz

CEP - HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar
Rua Amóbio 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



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

Reunião: 25/05/2010

Protocolo CEP – HUOC/PROCAPE:nº 64/2010
CAAE: 0058.0.106.000-10

Projeto: Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL10, MBL2, TNF α e TP53 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz: Um estudo voltado à políticas públicas de impacto social.

Pesquisador Principal: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Resultado:

- Resultado do Projeto – **APROVADO**

Magaly Bushatsky
Vice-coordenadora
CEP-HUOC/PROCAPE

Pavilhão Ovidio Montenegro – 1º andar
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

30/4/2010

CAAE - Certificado de Apresentação P...



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP

CAAE - 0058.0.106.000-10

Projeto de Pesquisa

Avaliação dos polimorfismos dos oncogenes E6 e E7 dos HPV's 16, 18, 31 e os polimorfismos nos genes IL 10, MBL2, TNFalfa e TFS3 em pacientes do Centro de Oncologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Um estudo voltado a políticas públicas de impacto social.

Área(s) Temática(s) Especial(s)

Genética Humana Biossegurança

Pesquisador Responsável

CPF

49671936415

Pesquisador Responsável

MARIA TEREZA CARTAXO MUNIZ

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Fase

Não se aplica

Recebimento de

21/04/10

Data de Entrega

30/04/2010

Recebimento:

Assinatura

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.