

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**AVALIAÇÃO DE QUATRO PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE
DNAS EM AMOSTRAS TECIDUAIS CERVICAIS INFECTADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

CAROLINA HARUMI CAVARSON

DOURADOS-MS

2017

CAROLINA HARUMI CAVARSON

**AVALIAÇÃO DE QUATRO PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE
DNAS EM AMOSTRAS TECIDUAIS CERVICAIS INFECTADAS
PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para
obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da
Grande Dourados, pela comissão formada por:

Aprovado em: 17 de Abril de 2017.

Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão (Orientador) UFGD – FCS

Prof^a. Dr^a. Kelly Cristina da Silva Brabes (Membro da banca) UFGD – FCS

MSc. Marcelo dos Santos Barbosa (Membro da banca) Mestre em Ciências
da Saúde - UFGD

**DOURADOS – MS
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C377a Cavarson, Carolina Harumi

AVALIAÇÃO DE QUATRO PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNAS
EM AMOSTRAS TECIDUAIS CERVICAIS INFECTADAS PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO: - / Carolina Harumi Cavarson -- Dourados:
UFGD, 2018.

25f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fábio Juliano Negrão

Co-orientadora: Lais Gonçalves Ortolani

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e
Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Diagnóstico Molecular. 2. HPV. 3. PCR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

AVALIAÇÃO DE QUATRO PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNAS EM AMOSTRAS TECIDUAIS CERVICAIS INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Artigo escrito seguindo as normas de publicação da revista *Journal of Microbiological Methods*, apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, como defesa de Trabalho de Conclusão de Curso, para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão.

DOURADOS-MS

2017

CAROLINA HARUMI CAVARSON

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, Emilia Ohara, me criou sozinha – exerceu papel de pai, mãe, amiga, cúmplice e confidente– sempre me incentivou a superar expectativas, e me apoiou (com seu jeito torto) durante todos esses 22 anos de vida, lutou e batalhou para que eu sempre pudesse ter do melhor e pudesse focar exclusivamente em estudar.

Ao Prof. Dr. Fábio J. Negrão, por ter aceitado me orientar, acompanhando meu crescimento científico e pessoal desde 2013. Por ter me introduzido ao mundo da biologia molecular e aflorar minha paixão pela área da saúde. Às mestrandas mais maravilhosas que existem, Lais e Luana. Sem vocês eu teria desistido há muito tempo, muito obrigada pelos puxões de orelha, pelos conselhos, pelas risadas, por todos momentos de cumplicidade compartilhados dentro e fora do laboratório.

À toda equipe do LPCS. Cada um contribuiu de um jeito singular na minha formação e crescimento. Seja com dicas, com broncas, com troca de reagentes, com atos de parceria nos dias que pareciam intermináveis, e nos experimentos que pareciam nunca dar certo. Pela felicidade geral quando uma banda aparecia, ou um experimento dava certo.

Aos professores envolvidos em todo o processo de me tornar uma profissional em Biotecnologia, seja durante as aulas ou durante as conversas informais. Em especial à Coordenadora, Prof. Claudia Damiani, por não ter me deixado abandonar o barco, por ter segurado todas as pontas possíveis, por ter abraçado todas as buchas e pepinos que eu constantemente lhe apresentei, por se tornar muito mais que uma professora/coordenadora, ser uma amiga com um colo muito acolhedor.

À cada pessoa que passou pela minha vida nos últimos cinco anos, tenho certeza que a soma de todos me fez crescer, e alguma lição foi aprendida com isso.

Por fim, mas não menos importante, ao meu Bonde da Biotec. Pessoas incríveis, e amigas incalculáveis que a UFGD me proporcionou. As melhores pessoas para se contar com o apoio, para rir, para chorar, para beber e claro para festar. Espero poder levar vocês para o resto da vida, cada memória construída de cada momento vivido com vocês são únicos. Com certeza vou me lembrar de cada cilada, cada dancinha, cada frase, cada momento de parceria e cumplicidade pela qual passamos juntos.

Ao Governo do Estado de Mato Grosso do Sul por meio da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, pelo apoio material e financeiro.

À todos, meus profundos agradecimentos, e meu mais sincero Obrigada por terem feito parte dessa etapa tão importante da minha vida e tornado tudo possível!

“The world is my country, to promote science is my religion”

(Christiaan Huygens)

AValiação de Quatro Protocolos de Extração de DNAs em Amostras Teciduais Cervicais Infectadas pelo Papilomavírus Humano

Carolina Harumi Cavarson; Fábio Juliano Negrão.*

*Faculdade de Ciências Da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Email: <fjnegrao@gmail.com>

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado uma infecção sexualmente transmissível, sendo um fator determinante para o desenvolvimento de câncer cervical. A metodologia de prevenção do câncer de colo de útero preconizada no Sistema Único de Saúde é a análise de alterações citológicas, conhecido popularmente como Papanicolaou. Entretanto o diagnóstico molecular vem sendo indicado como uma técnica mais sensível à presença do vírus, que pode estar inativo nas células hospedeiras, não estando necessariamente causando uma infecção, contudo tendo impacto na prevenção das alterações cancerígenas. Uma das técnicas moleculares capaz de detectar o HPV é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) sendo necessário primeiro extrair o DNA da amostra coletada, que impacta na sensibilidade da prova diagnóstica. Com o objetivo de padronizar a metodologia de melhor desempenho em fragmentos de tecidos, neste trabalho, comparamos quatro protocolos de extração de DNA total em biópsias tecidual cervical coletadas em mulheres apresentando alterações citológicas compatíveis com a infecção pelo HPV, na cidade de Dourados-MS, Brasil. Foram testados os protocolos 1) HotSHOT; 2) Wizard® Genomic DNA Purification Kit; 3) Boom; 4) Dnaesy Blood and Tissue Qiagen. As amostras extraídas foram submetidas a mensuração por espectrofotometria em microtitulação e amplificadas pela reação em cadeia pela polimerase utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GH20/PCO4 e Mucosal HPV. Dentre os protocolos testados, o protocolo que apresentou maior taxa absorvância 260/280, de até 4nm, e se apresentou mais eficiente tanto para o controle humano como para o diagnóstico do HPV durante a amplificação foi o protocolo Dnaeasy.

Palavras- chave: Diagnóstico Molecular; HPV; PCR.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is considered a sexually transmitted infection, being a determining factor for the development of cervical cancer. The prevention methodology of cervical cancer recommended by the Brazilian Unified Health System is the analysis of cytological alterations, popularly known as Papanicolau. However, the molecular diagnosis has been indicated as a technique more sensitive to the virus presence, which may be inactive in the host cells not necessarily causing an infection, yet having an impact in the prevention of the cancerous changes. One of the molecular techniques capable of detecting HPV is the Polymerase Chain Reaction (PCR). To do so, it is necessary to first extract the DNA from the collected sample, which impacts on the sensitivity of the diagnostic test. In order to standardize the methodology for better performance in tissue fragments, we compared four protocols for total DNA extraction in cervical tissue biopsies collected in women showing cytological alterations compatible with HPV infection in the city of Dourados-MS, Brazil. The following protocols were tested: 1) HotSHOT; 2) Wizard® Genomic DNA Purification Kit; 3) Boom; 4) Dnaesy Blood and Tissue Qiagen. The extracted samples were measured by spectrophotometry and amplified by the Polymerase Chain Reaction using the primers GH20 / PCO4 and Mucosal HPV. Among the protocols tested, the protocol which presented a higher 260/280 absorbance rate, up to 4nm, and was more efficient for both human control and HPV diagnosis during amplification was the Dnaeasy.

Keywords: HPV; Molecular Diagnosis; PCR.

REVISÃO

Sobre o Papilomavírus Humano

O Papilomavírus Humano, também conhecido como HPV, é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*. É considerado um vírus pequeno com um genoma de apenas 8 pares de quilobases (kbp), não envelopado, com seu capsídeo de formato icosaédrico. Seu genoma é do tipo dupla fita (HARPER; 1998, p.271), contendo três regiões: uma distal (L), com dois genes (L1 e L2) - que codificam as cápsulas das proteínas virais; uma proximal (E) que codifica as proteínas envolvidas na replicação e no controle da transcrição (denominadas de E1 e E2) e dos principais genes (E5, E6 e E7); e, por último, entre as regiões E e L, há uma longa região de controle (LCR), vinculada a vários locais que contêm fatores de transcrição nucleares e virais (NAKAGAWA et al., 2010).

Segundo o Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), existem mais de 150 tipos de HPVs; alguns deles apresentam potencial oncogênico, os quais podem ser classificados como “alto risco” e “baixo risco”. Podendo causar lesões conhecidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (classificadas em graus 1, 2 e 3, dependendo da espessura do epitélio que apresenta células maduras e diferenciadas) (SELLORS e SANKARANARAYANAN). De acordo com o Instituto Oncoguia, os HPVs de alto risco mais comuns são o 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 58; enquanto os de baixo risco são o 6 e 11.

Os mecanismos de oncogênese do HPV conhecidos até hoje incluem a interação da proteína E6 com a proteína p53 e pelo menos outros 12 fatores celulares; interação de E7 com a proteína Rb e pelo menos outros 15 fatores celulares; efeitos em outras proteínas proximais no ciclo celular; efeitos de inserção na oncogênese celular; e os cofatores incluem o tabagismo e o possível papel da infecção pelo Vírus da Herpes Simples 2 (HSV-2) (HARPER; 1998, p.94).

A infecção pelo HPV

A principal forma de transmissão do vírus é por via sexual, o que enquadra o HPV como uma infecção sexualmente transmissível (IST), podendo algumas vezes haver transmissão vertical – durante o parto. O contágio ocorre quando o vírus penetra a célula hospedeira, liberando e acoplado seu material genético, utilizando-se dos mecanismos de replicação celular do hospedeiro (LIBERA et al. 2016)

A infecção pelo HPV é geralmente assintomática, de caráter transitório, regredindo espontaneamente na maioria dos casos. O INCA estima que apenas 5% dos infectados apresentem sintomas como o aparecimento de condiloma acuminados (verrugas genitais) e outras lesões genitais.

Métodos de diagnósticos

Os métodos de diagnósticos disponíveis atualmente se dividem em duas categorias: citopatológicos e moleculares (GUIA DO HPV; 2013, p. 19-21)

Dentre os métodos citopatológicos, encontra-se o Papanicolaou, considerado o exame preventivo mais comum, capaz de detectar as alterações celulares e um possível câncer; entretanto não é capaz de diagnosticar a presença do vírus. Ainda assim é considerado o melhor método para detectar câncer de colo do útero, identificando entre 80% e 95% dos casos da doença. O exame de Colposcopia é complementar ao Papanicolaou quando este apresenta anomalias celulares, assim, o Colposcópico, que aumenta de 10 a 40 vezes o poder de visão do médico, permite a localização precisa das lesões precursoras do câncer de colo do útero. Após a localização das regiões com suspeita de doença, remove-se um fragmento de tecido (biópsia) para confirmação do diagnóstico.

Dentre os métodos moleculares existem o exame de Captura Híbrida, e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ambos altamente sensíveis e capazes de detectar a presença do vírus ainda que o paciente não apresente sintomas (Manual Técnico de Prevenção do Câncer o Colo do Útero; p.7).

Prevenção e Tratamentos Disponíveis

O exame preventivo mais eficaz é o Papanicolaou, que pode apresentar uma redução das taxas de incidência de câncer cervical invasor de até 90%, quando o rastreamento apresenta boa cobertura (80%, e é realizado dentro dos padrões de qualidade (Gustafsson et al., 1997).

Em 1988, o Ministério da Saúde, por meio do INCA, estabeleceu que o ideal é que ocorra a realização do exame preventivo uma vez por ano e, após 2 exames anuais consecutivos negativos, a cada 3 anos.

Segundo a Secretaria de Saúde do Paraná, em conjunto com o Ministério da Saúde e o Viva Mulher - Programa de Controle do Câncer do Colo de Útero:

“ A periodicidade trienal de realização do exame citopatológico do colo do útero, estabelecida pelo Ministério da Saúde do Brasil, em 1988, e recomendada pelo Viva Mulher – Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e Mama, permanece atual e está em acordo com as recomendações dos principais programas internacionais. Segundo a OMS, após um resultado negativo, a realização trienal do exame é tão eficiente quanto a anual, no que diz respeito à redução das taxas de incidência por este câncer. Além disso, a recomendação de que a periodicidade seja trienal, somente após dois resultados consecutivos, obtidos em exames realizados com intervalo anual, permite identificar os casos nos quais possa ter ocorrido um resultado falso-negativo.”

Outro método de prevenção existente são as vacinas. No Brasil, seguindo a recomendação da OMS, é a quadrivalente, com eficácia de 98%, protegendo o indivíduo dos tipos 6, 11, 16 e 18 da doença. A vacinação é feita em três doses, sendo a terceira um reforço para aumentar a durabilidade da vacina e deve ser aplicada aos passados cinco anos.

A vacina previne a transmissão do HPV. De acordo com o Ministério da Saúde, a vacina protege, em até 98,8%, contra quatro subtipos do HPV, sendo que dois deles são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer de colo de útero em todo o mundo (CARVALHO J.J.M.)

O SUS oferece o tratamento de lesões provenientes da infecção pelo HPV, tais como os procedimentos de colposcopia e a Cirurgia de Alta Frequência (CAF).

Epidemiologia do HPV

Um estudo realizado em 2008 (NAKAGAWA et al., 2010) observou que cerca de 5-15% de mulheres são infectadas anualmente por algum tipo de HPV classificado como de alto risco, e aproximadamente 25% da incidência da infecção se concentra na faixa etária dos 15-19 anos. O HPV possui tropismo por células epiteliais cutâneas e mucosas, e citado anteriormente, a transmissão ocorre por contato direto. Os principais fatores de risco comprovados até a presente data são o início da atividade sexual e o número de parceiros (ALVES., 2013).

Segundo dados divulgados em 2005 pela *Internacional Agency for Research on Câncer* (IARC), na Colômbia, foi registrada a incidência do HPV em 5 a cada 100 pessoas por ano, nos Estados Unidos da América de 15,8 a cada 100 pessoas; no Canadá de 16,8 a cada 100 pessoas; e no Brasil 9,5 a cada 100 pessoas (Fig. 1.).

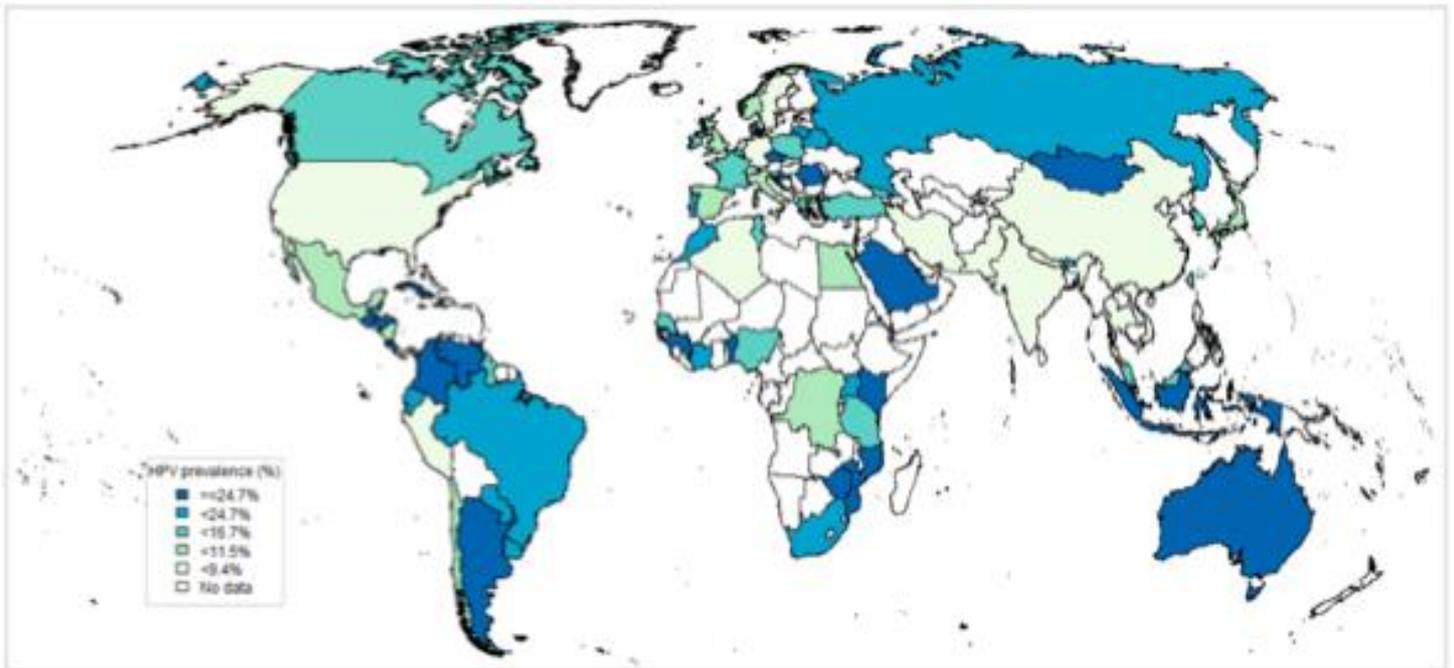


Figura 1: Epidemiologia da infecção pelo HPV em mulheres com citologia normal no mundo (Bruni L. et al, 2017).

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (*Human Papillomavirus* – HPV), pertence à família *Papillomaviridae*, é um vírus icosaédrico, não envelopado e seu genoma é do tipo dupla fita de ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Desoxyribonucleic Acid* – DNA), com aproximadamente 7.400 pares de base (HARPER, 2012). O HPV é um fator necessário para o desenvolvimento da maioria dos casos câncer de colo uterino (BOSCH et al. 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer de colo uterino é o segundo mais comum entre as mulheres no mundo, com aproximadamente 445.000 novos casos diagnosticados e com 270.000 mortes em 2012, sendo 85% desses casos em países em desenvolvimento (OMS, 2013)

De acordo com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano (INCTHPV) existem mais de 150 tipos de HPVs classificados de acordo com seu risco oncogênico, sendo estes: de baixo grau (infecção assintomática e transitória causando lesões benignas); alto grau (infecção persistente provocando alterações mais graves que podem levar ao desenvolvimento de adenocarcinomas *in situ*) e indeterminado. Os genótipos pertencentes ao grupo de baixo risco são 6, 11, 40, 42, 43, 44; e ao de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (JACOBS et al, 1997).

A transmissão mais frequente é a sexual, sendo assim considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST), assim classificada pelo departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. A infecção pelo HPV é considerada um importante problema de saúde pública por sua alta prevalência e grande transmissibilidade, aproximadamente 75% da população sexualmente ativa já entrou ou entrará em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida (SILVEIRA et al, 2005).

No diagnóstico de HPV pelo Sistema Único de Saúde (SUS) a metodologia preconizada é o exame citopatológico, também conhecido como Papanicolau, que permite classificar as alterações celulares em graus de diferenciação de acordo com o sistema Bethesda em NIC (neoplasia intra-epitelial cervical) I II e III e adenocarcinomas *in situ*, dependendo da proporção da espessura do epitélio que apresenta células maduras e diferenciadas (Internacional Agency for Research On Cancer).

Na detecção de lesões de alto grau, é indicado a realização de outros exames, como por exemplo, a colposcopia (INCA). De acordo com o Manual Técnico dos Profissionais da Saúde (BRASIL, 2002),

“a colposcopia é um exame que consiste na visualização do colo uterino através do colposcópio (um aparelho que possui iluminação e lentes de aumento), após a aplicação de soluções de ácido acético, entre 3% e 5% e lugol. É um exame usado para avaliar os epitélios do trato genital inferior e, quando necessário, orientar biópsias e cirurgia de alta frequência (CAF).”

Entretanto, o exame citológico ou histopatológico de amostras cervicais não permite a caracterização viral, enquanto métodos moleculares proporcionam tanto a detecção viral, como sua tipagem (ALVAREZ-ALDANA et al, 2015). Dada a maior sensibilidade dos métodos moleculares de diagnósticos (DO CARMO E FIORINI, 2007), este estudo se mostra extremamente necessário, tendo como objetivo comparar quatro protocolos de extração de DNA viral a fim de se determinar a técnica mais indicada para trabalhar com amostras do tipo tecidual cervical em mulheres infectadas pelo Papilomavírus humano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem das Amostras

Para a realização deste trabalho utilizamos oito fragmentos de colo de útero colhido durante biópsia, HPV positivas, previamente coletadas em mulheres que apresentaram alterações citológicas no Centro de Atenção à Mulher, na cidade de Dourados – MS, Brasil.

2.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÔMICO

2.2.1. Método HotSHOT (Truett GE et al. 2000)

Foram adicionados 125uL do tampão de lise HotShot (25mM NaOH, 0.2mM EDTA em água) à amostra. Incubado por 60 min a 95°C, removido então do calor e adicionados 125uL do tampão de neutralização (40mM Tris HCl) na amostra. Agitou-se no vórtex, centrifugou-se por 4 min a 15.000rpm e armazenou-se entre 4°C à -20°C.

2.2.2. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)

As extrações foram realizadas de acordo com as instruções contidas no protocolo incluso no Kit. As amostras foram incubadas no banho seco a 56 °C por três horas

2.2.3. Protocolo de Boom - Modificado para tecido (Boom R et al. 1990)

Ao microtubo contendo a amostra foram adicionados 100µL de SDS (100g/ml), 30µL de proteinase K e agitou-se em vórtex por 1 minuto. Acrescentou-se 40µL de sílica, e agitou-se em vórtex novamente por 1 minuto. Centrifugou-se o tubo por 1'30" a 12.800rpm, e em seguida descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 500µL de Tampão de Lavagem (120g de isotiocianato de guanidina, 100ml de Tris-HCL 0,1M), agitou-se em vórtex por 15 segundos, centrifugou-se a amostra por 1,5 minutos a 12.800rpm, descartando-se todo o sobrenadante novamente. Adicionou-se mais 500µL de tampão de lavagem, agitou-se em vórtex por 15 segundos e centrifugou-se por 1,5 minutos descartando o sobrenadante novamente. Repetir a lavagem com 500µL de etanol a 70% com vórtex e centrifugada posteriormente. Após descartado o sobrenadante adicionou-se 500µL de acetona P.A., agitou-se em vórtex por 15 segundos, centrifugou-se por 2 minutos à mesma velocidade e descartou-se o sobrenadante. O microtubo foi deixado para secar em estufa a 37°C por 30 segundos. Em seguida foi adicionado 150µL de Tampão de eluição (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA), agitou-se por 1 minuto, centrifugou-se por 5 minutos à mesma velocidade. E por fim transferiu-se 100µL do sobrenadante para um novo microtubo, e centrifugou-se por mais 5 minutos.

2.2.4. DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

O procedimento de extração foi realizado de acordo com as instruções contidas no Handbook incluso no Kit.

2.3. Análises das Amostras

Foram utilizadas duas técnicas de avaliação do DNA extraído destas amostras: 1- Qualitativa: com a visualização de banda através da eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed (CRISAFULI et al. 2015) (2- Quantitativa: obtida a partir da razão das taxas de absorvância de 260/280nm, através do BioDrop µLITE (BioDrop™ µLITE dsDNA Application Note). Adicionalmente, para verificarmos a qualidade das amostras, foi executada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction* –PCR) com dois pares de oligonucleotídeos: PCO4/GH20 (como controle humano, pelo gene da β- globina) (SAIKI et al. 1988) com produto final de 256pb; e Mucosal HPV consensus (STEPHEN et al. 2000) com produto final entre 140 – 160pb

(Quadro 1). O produto da PCR também foi revelado em eletroforese em gel de agarose a 2%.

Quadro 1. Informações sobre os oligonucleotídeos utilizados

Primer	Sequencia 5`-3`	Produto
PCO4	CAACT TCATC CACGT TCACC	256pb
GH20	GAAGA GCCAA GGACA GGTAC	
Mucosal HPV	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	140-160pb
Consensus F/R	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quatro diferentes protocolos de extração avaliados pela PCR, a capacidade de amplificação dos diferentes protocolos estão demonstrados no quadro 2 e nas figuras 1 e 2. A PCR com o gene da β -globina humana amplificou em quase todas as amostras, confirmando que a extração de DNA total havia ocorrido. Entretanto, não houve diferença significativa na amplificação do gene da beta globina entre os quatro protocolos.

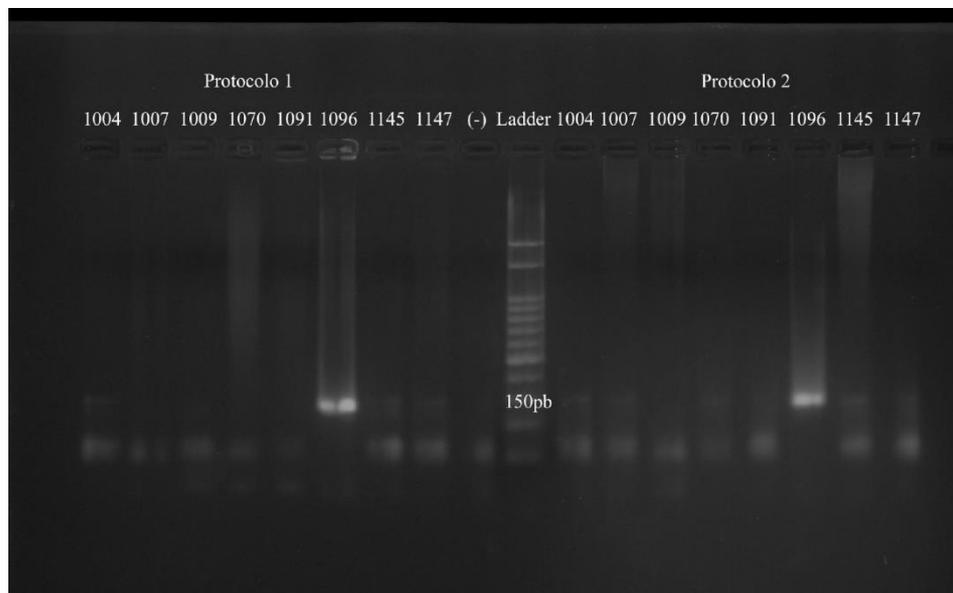


Figura 1 – Gel de agarose a 2% com amostras amplificadas a partir dos protocolos HotSHOT e Wizard Genomic Purification Kit (1 e 2 respectivamente)

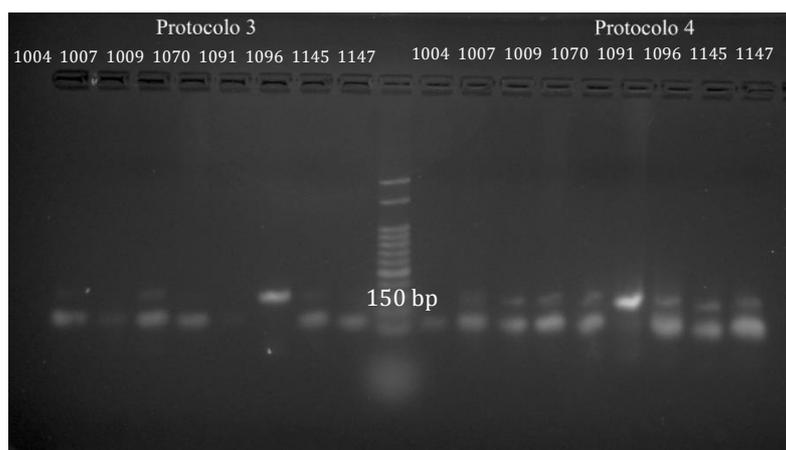


Figura 2 – Gel de agarose a 2% com amostras amplificadas a partir dos protocolos de Boom Modificado para Tecido e Dnaeasy Blood and Tissue (3 e 4 respectivamente)

Dos quatro protocolos testados, pudemos observar através da amplificação por PCR do HPV que os mais eficientes em questão de bandas aparentes seriam os protocolos 2 e 4, ambos comercialmente disponíveis na forma de kit: Promega e Qiagen, respectivamente.

Quadro 2. Comparação de quatro protocolos de extração de DNA em 8 biópsias cervicais em termos de amplificação de β - globina e HPV

Protocolos	N	β -globina	(%)	HPV	
					(%)
HotSHOT	8	8	100	4	50
Wizard	8	7	87,5	7	87,5
Boom Modificado	8	7	87,5	5	62,5
Dnaeasy	8	8	100	7	87,5

Em relação às concentrações obtidas pelos quatro protocolos, pode-se consultar a tabela 3, que evidencia o resultado anterior, compactuando com o melhor desempenho destes protocolos 2 e 4 na amplificação por PCR. Embora as concentrações obtidas fossem melhores no protocolo 1, sua qualidade se mostrou comprometida no teste da PCR e na análise da extração por eletroforese em gel de agarose, como pode-se observar na figura 1, 2, 3 e 4.

Quadro 3. Concentração de DNA (aproximado) e qualidade do DNA (razão 260/280) utilizando quatro diferentes protocolos de extração.

Protocolos	Concentração (ng/uL)	Razão 260/280
HotSHOT (figura 3)	98,99 ~ 381,3	1,3 ~ 1,6
Wizard (figura 4)	2,28 ~ 69,19	1,4 ~ 13
Boom Modificado (figura 5)	0 ~ 22,8	1,3 ~ 1,4
Dnaeasy (figura 6)	0,39 ~ 3,32	1,9 ~ 4

A eficiência das amostras extraídas nos quatro protocolos testados avaliada pela performance na PCR de β -globina variou entre 87,5% a 100%; enquanto para o HPV este valor foi de 50% a 87,5%.

Estes resultados, em conjunto, apontam que o melhor protocolo de extração de DNA viral a fim de se utilizar na PCR para detecção do HPV é o protocolo 4.

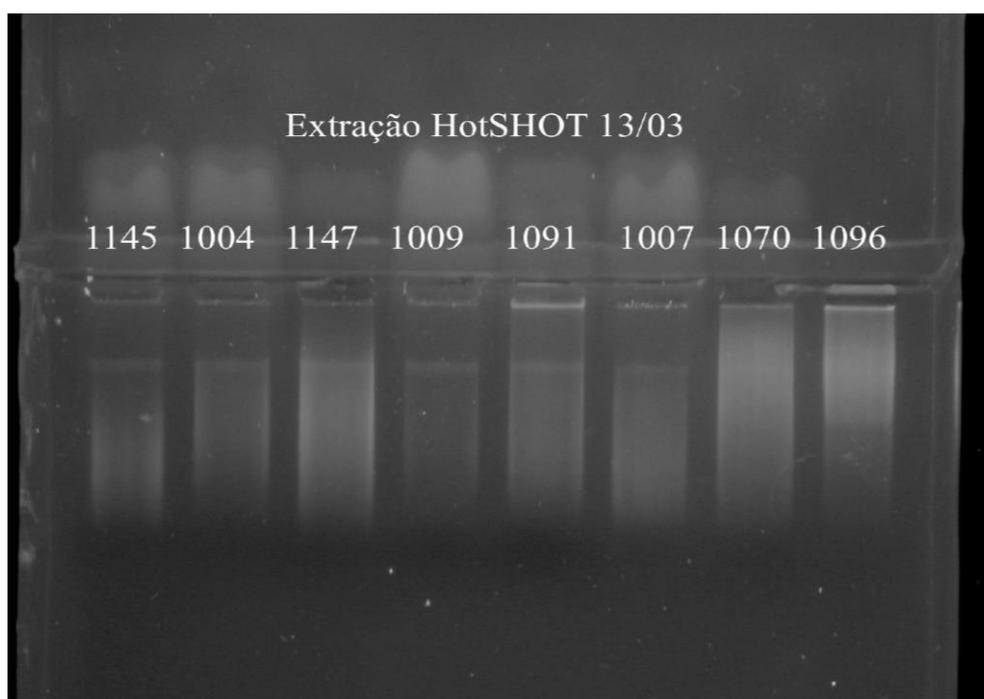


Figura 3. Gel de agarose a 1%, com oito amostras extraídas pelo protocolo HotSHOT. Baixa visibilidade das bandas indicando baixa qualidade do material extraído.

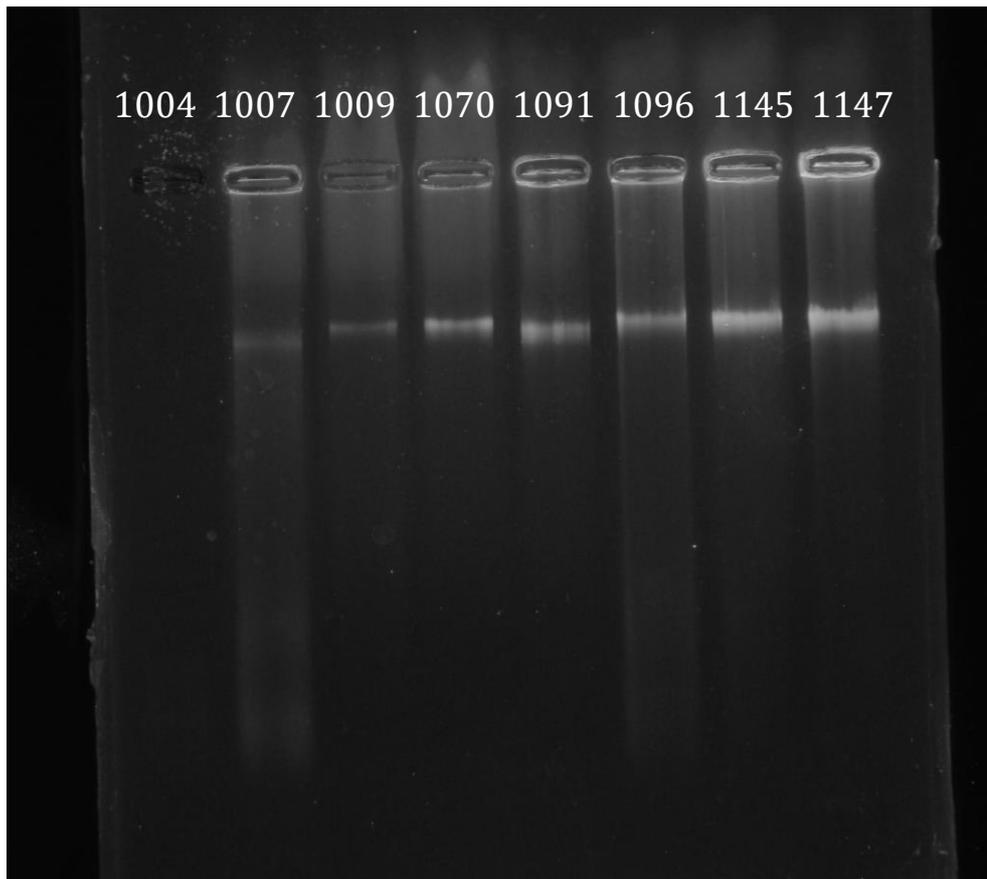


Figura 4. Gel de agarose a 1%, com oito amostras extraídas pelo protocolo Wizard.

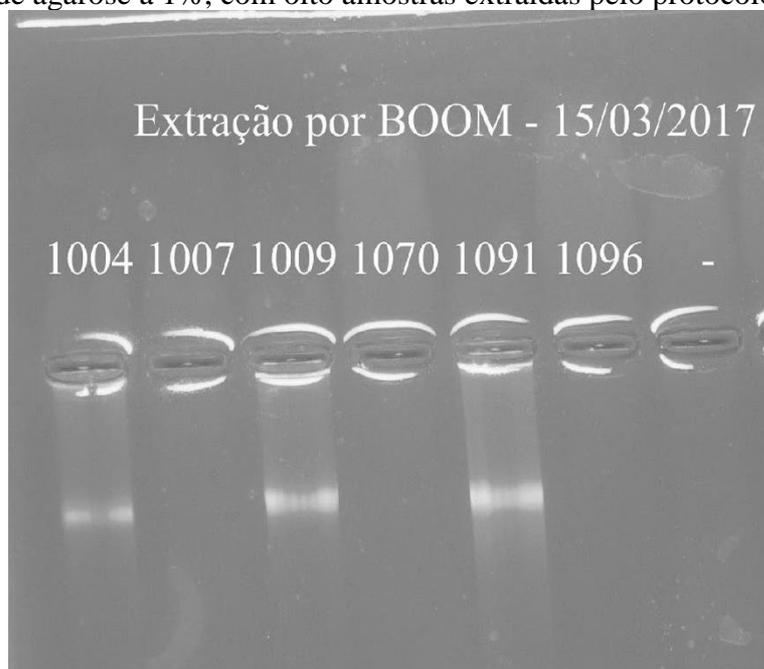


Figura 5. Gel de agarose a 1%, com oito amostras extraídas pelo protocolo Boom Modificado.

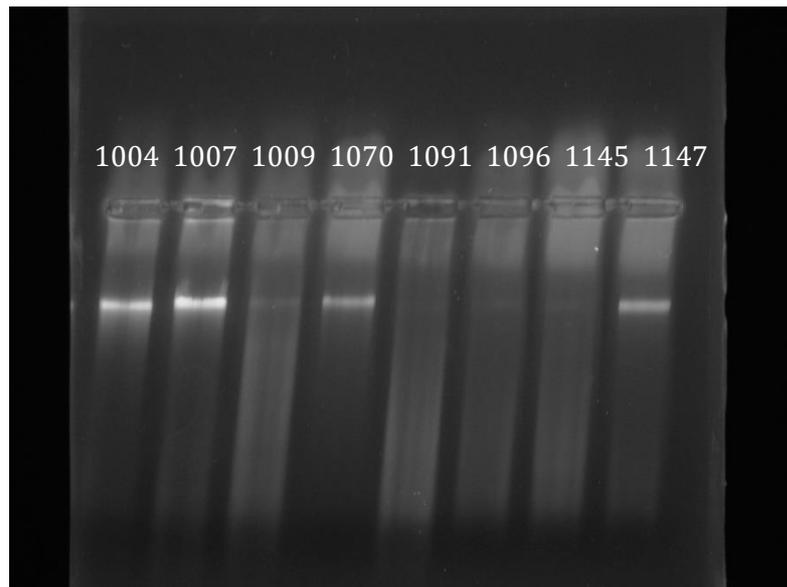


Figura 6. Gel de agarose a 1%, com oito amostras extraídas pelo protocolo Dnaeasy.

O sucesso de um protocolo e sua eficiência, podem variar em diferentes tipos de tecido ou célula, diferentes tipos de fixação, tempo de armazenamento, temperatura de armazenamento, fatores que podem levar à degradação do material genético da amostra (ALVAREZ- ALDANA et al. 2015)

Em nosso estudo, o protocolo 4 – Dnaeasy Blood and Tissue, embora tenha apresentado a mesma porcentagem de visualização de bandas quando amplificado com os oligonucleotídeos de HPV que o protocolo 2, pode ser considerado o melhor pois a taxa de amplificação do gene da β -globina foi de 100%, enquanto o protocolo 2 apresentou apenas 87,5%. O que pode ser prejudicial pois poderia levar a resultados falso-negativo, uma vez que não haveria o controle humano sendo expresso.

4. CONCLUSÃO

A partir deste estudo comparativo de quatro protocolos de extração de DNA em amostras do tipo biópsia tecidual cervical, é conclusivo que o protocolo mais indicado para este tipo de amostra, a fim de se trabalhar com o diagnóstico molecular é o protocolo 4 – Dnaeasy Blood and Tissue, comercialmente disponível em forma de kit- DNAeasy (Qiagen)

5. APOIO

Governo do Estado de Mato Grosso do Sul por meio da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT, pelo apoio material e financeiro.

6. REFERÊNCIAS

BioDrop™ μLITE dsDNA Application Note. Using a BioDrop μLITE spectrophotometer to measure the concentration of low volume samples of dsDNA.

Boom R; Sol CJ; Salimans MM; Jansen CL; Wertheim-van Dillen PM; van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids . **Journal of Clinical Microbiology**. 28 : 495 – 503.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, *et al.*
The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer
Journal of Clinical Pathology 2002;**55**:244-265.

Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. Crisafuli F.A.; Ramos E.B.; Rocha M.S. *European Biophysics Journal*. 2015 Feb;**44**(1-2):1-7. doi: 10.1007/s00249-014-0995-4. Epub 2014 Nov 13.

Condiloma Acuminado (Papilomavírus Humano - HPV). **Departamento de IST, Aids, e Hepatites Virais**. Acesso em 11 de abril. Disponível em:
<<http://www.aids.gov.br/pagina/condiloma-acuminado-hpv>>

Do Carmo E.F.S; Fiorini A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. **SaBios-Rev. Saúde e Biol.**, v. 2, n. 1 p. 29-31.

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) – **Handbook**.

Genotypes in Cervical Scrapings. **Journal of Clinical Microbiology**, Mar. 1997, p. 791–795.

Harper, D.R. Garland Science. ISBN: 978-0-8153-4150-5. **Viruses: biology, applications, and control**. 2012. Appendix I Virus Replication Strategies, p. 271.

Instituto do HPV. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças do Papilomavírus Humano**. Acesso em 11 de abril. Disponível em:
<<http://www.incthpv.org.br/default.aspx>>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer de colo de útero: Detecção precoce. Acesso em 13 ago. 2016. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uter0/deteccao_precoce>

Introdução à neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Capítulo 2. **International Agency for Research on Cancer**. Acesso em 11 de abril. Disponível em:
<<http://screening.iarc.fr/colpochap.php?lang=4&chap=2>>

Jacobs, M.V.; Snijders, P.J.F.; Brule, A.J.C.V.D.; Helmerhorst, T.J.M.; Meijer, C.J.L.M.; Walboomers, J.M. A General Primer GP51/GP61- Mediated PCR-Enzyme Immunoassay Method for Rapid Detection of 14 High-Risk and 6 Low-Risk Human Papillomavirus

Manual Técnico de Profissionais da Saúde. Prevenção do câncer do colo do útero. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2002.

Neoplasia Intra-Epitelial Cervical -NIC. Condutas do INCA/MS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2000, 46(4): 355-5

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988) **Science**, 239, 487-491.

Silveira, L. M. S., Silva, H. A., Pereira, I. P., & Pinheiro, V. M. F. (2005). Critérios citomorfológicos para o diagnóstico de HPV e sua relação com a gravidade da neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 37(2), 127-132.

Truett, G.E; Heeger P; Mynatt R.L; Truett A.A; Walker J.A; Warman M.L; **BioTechniques** 29: 52-54, 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT).

Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) – **Handbook**.

World Health Organization. Human Papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Acesso em: 13 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>>